

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**Kuantum Nokta [Qdot] Temelli Biyoalgılayıcı Prob Kullanılarak
Gözdeki Lenf Drenajının Varlığı Üzerine Bir Araştırma**

Proje No: TOA-2017-7362

Proje Türü:

Öncelikli Alan.

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. İsmail Hakkı NUR

Veteriner Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı

Prof. Dr. Kuddusi ERKİLİÇ / Tıp Fak. Göz hastalıkları ABD.
Doç. Dr. Şerife SAÇMACI / Fen Fak. Analitik Kimya ABD.
Arş. Görv. İmdat ORHAN / Veteriner Fak. Anatomi ABD.

Mart 2018
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Öncelikli alan proje kapsamında yürütülen Poje Kod No: TOA-2017-7362 olan “Kuantum Nokta Qdot Temelli Biyoalgılayıcı Prob Kullanılarak Gözdeki Lenf Drenajının Varlığı Üzerine Bir Araştırma” alı çalışmamıza ERÜ BAP Birimi tarafından desteklendiği için başta proje yürütücüsü olarak şahsım ve çalışma arkadaşlarım adına teşekkür ediyorum.



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYЕК)



Tarih: 15.03.2017

Toplantı Sayısı: 03

Karar No:17/026

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 15.03.2017 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
Serpil SARIÖZKAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	KATILMADI
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Zeynep SOYER SARICA	Dr.	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	KATILMADI
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi A.D.'dan Prof. Dr. İsmail Hakkı NUR tarafından sunulan "Kuantum Nokta (Qdot) Temelli Biyolojik Proje Kullanılarak Gözdeki Lenf Drenajının Varlığı Üzerine Bir Araştırma." başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 15.03.2017

Etik kurul Başkan Vekili : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA

İmza :

ÖZET

Glokom, dünyada yaklaşık 70 milyon kişiyi etkileyen, sonunda körlüğe kadar ilerleyen önemli bir hastalıktır. Bütün tedavi göz iç basıncının artmasını ortadan kaldırmak amacına yöneliktir.

Klasik anatomi kaynaklarına göre, camera oculi anterior'de lenf sistemi bulunmamaktadır. Son zamanlarda çeşitli markırlar kullanılarak yapılan araştırmalarda; rat, insan ve koyun gözünde lenfatik bir drenajın varlığı ortaya konulmuştur. Lenf sıvısının dolaşımı lenfoid dokulardan tahliye olduğu bilindiğine göre, lenfatik dokuların varlığı göz drenajında rol aldığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Wistar albino rat ırkı erkek ve dişi Ratlar'da her iki gözün camera oculi anterior'una enjeksiyon işlemi yapılmıştır. Sol intraokuler kameraya Qdot655, sağ intraokuler kameraya ise İndocyanin green'den 1-1,5 µl enjekte edilerek hiperspectral görüntüle sistemi kullanılarak gözün uveo-lenfatik drenajı araştırılmış, her iki gözde de lenfatik drenajın varlığı tespit edilmiştir. Erkek ve dişi ratlar arasında fark bulunmadığı görülmüştür. Çalışmaya başlamadan önce IOB ölçülmüş, Qdot ile humor aqueus'un arasında bir etkileşimin olmadığı, floresan ışık mikroskobunda Qdot'ın yer yer toplu olması nedeniyle floresan verdiği tespit edilmiş, scan elektron mikroskopik çalışmada da görüntülerin EDX leri alınarak haritalandırılmış böylelikle gerek schlemm kanalında gerekse submandibular lenf yumrusunda tespit edilmiştir.

Bu araştırma glokom üzerinden körlüğü önlemek için yeni tedavi metotlarına bir bakış kazandıracağı, deneysel olarak farmakolojik çalışmalarda bu türün model olarak kullanılabileceği görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kuantum noktaları, Biyo-görüntüleme, Lenfatik Drenaj, Rat, Lenfagiogenesis

ABSTRACT

Glaucoma is an important disease that affects about 70 million people worldwide and eventually progresses to blindness. The whole treatment is aimed at removing the increase in intraocular pressure.

According to the sources of classical anatomy, there is no lymph system in the camera oculi anterior. In recent studies using various markers; the presence of a lymphatic drainage in the rat, human and sheep eyes. Lymph fluid circulation is thought to be involved in the drainage of lymphatic tissue in the presence of the eye, which is known to be evacuated from lymphoid tissues.

In this study, Wistar albino rats were injected into the camera oculi anterior of both eyes in male and female rats. Uveo-lymphatic drainage of the eye was investigated using a hyperspectral imaging system by injecting 1-1,5 µl of indocyanine green into the left intraocular lens of Qdot655 and the right intraocular chamber, and the presence of lymphatic drainage was detected in both eyes. There was no difference between male and female rats. Before starting to work, IOB was measured, and there was no interaction between Qdot and humor aqueous. Fluorescence light microscopy revealed that Qdot gave fluorescence due to the localized accumulation of electrons. In the scan electron microscopic study, the images were mapped by taking EDX images and thus the submandibular lymph .

This research appears to be able to use this model as experimental model in pharmacological studies, which will give a glimpse of new treatment methods to prevent blindness through glaucoma.

Keywords: Quantum dots, Bio-imaging, Lymphatic drainage, Rat, Lymphangiogenesis

Bio-imaging, Lymphatic drainage, Rat, Lymphangiogenesis

ÇALIŞMANIN AMAÇ ve KAPSAMI:

Bilindiği gibi Lenfatik sistem, çoğu organda hücre dışı sıvıları, çözünen maddeleri ve proteinleri boşalttığı bilinen sistemdir. Gözde var olduğunu düşündüğümüz lenfatik akışın varlığını görüntülenmesi başlı başına körlüğe kadar varan bir hastalığın teşhis ve tedavisinde son derece önemlidir.

Son zamanlarda, çeşitli göz hastalıkları için anti-anjiyogenik tedavi yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, lenfagiogenesis, corneal transplantasyonunda red etmede dahil ilerleyen ocular tümörler patolojisi bakımında da önemli rol oynar. Günümüzde çoğu göz hastalıkları, ödem ve de özellikle de inflamatuvar gibi hastalıklarda lenfagiogenesis'in rolü bilinmemektedir. Gözdeki lenfatik ve lenfagiogenesis'in daha iyi anlaşılması, tedavi edilemez oküler hastalıklar için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için bir temel oluşturacaktır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ocular sıvı dengesinde görev yapan farklı lenfatik kanallar olabileceği, ayrıca corneal limbus, corpus siliare, gl.lacrimalis, orbital meningesler ve extra orbital kaslarda lenfatik benzeri bir sistemi olabileceği vurgusu yapılmaktadır.

Literatürde in-vivo görüntüleme metoduyla yapılan araştırmada farelerin sol göz içine yapılan enjeksiyonlardan 5, 20, 40 dk ve 2, 6, 24 saat sonrasında yapılan görüntülemelerde boyun bölgesinde Qdot'ın sinyal verdiği ve daha sonra sol submandibular lenf yumrusunda sinyalizasyon görüldüğü, gözde bir lenf drenajının varlığı hakkında elimizdeki ilk ve en önemli bulgu olması bakımından çok kıymetlidir.

Doku sistemlerinde lenfatik ağı görselleştirmek için kullanılan geleneksel yöntemler, genellikle manyetik rezonans lenfajiyografi, optik lenfajiyografi ve geleneksel organik floroforlardır.

Lenfatik damarları in-vivo olarak görselleştirmek için çeşitli lenfatik endotelial markerlar kullanılarak, fluoresan görüntülenmesi sağlanmıştır. Bununla birlikte, organik floroforlarla optik çözünürlük engellendiği için, yerine daha küçük ancak etki alanı daha geniş spektrumu

olan invaziv olmayan canlı görüntüleme için, Qdot eşsiz bir kullanım materyali olarak karşımıza çıkmaktadır.

Qdot'ların optik özellikleri; bir çekirdek-kabuk nano-parçacıkları ile hem canlı hücrelerde hem de hayvanlarda araştırılan dokunun, uzun süreli tekli veya eşzamanlı olarak çok renkli görüntülenmesi için avantaj sağlamasıdır. Kuantum noktaları sayesinde hücrede ya da vücutta büyük bir iç parlaklık (floresans) nedeniyle hiperspektral görüntüleme imkanı sağlamasıdır.

Böyle bir çalışma ile ülkemizde bir ilki ve üniversitemiz olarak yapılabilirliğini hem göstermek hem de ratlarda lenfatik drenajın varlığına ilişkin doğrudan delil ortaya koyma amaçlanmaktadır. Ayrıca erkek ve dişi ratlar'da lenfatik bir drenajın varlığının bulunup bulunmadığını, varsa hangi lenf düğümüne döküldüğünün ortaya konulması ve erkek ve dişi arasında varsa farklılığı ortaya koyması açısından oldukça önemli olacaktır.

Humor aquosus, in-vivo floresan görüntüleme ile tespit edilmeye çalışıldıktan sonra ratlar ötenazi edilerek micro CT'de (Skyscan 1172), Qdot'lar kullanılarak izlenmeye çalışılacaktır. Kuantum nokta işaretleme sistemi ve floresan izleyicilerin kullanımı, geleneksel organik floroforlara kıyasla benzersiz avantajlar sunacağına inanılmaktadır.

En önemlisi ise, uzun süreli ve pasif olmayan canlı görüntüleme imkânı sunacaktır. Böylece, glukom gibi çok ciddi göz hastalığını azaltmak ve glokoma karşı körlüğü önlemek için yeni tedavilerin gelişimini tetikleyebilecek oküler lenfatiklerin farmakolojik manipülasyonu için ideal bir platform olarak rat modelinin kullanılması amaçlandı.

Çalışma kapsam olarak erkek ve dişi ratlarda camera oculi anterior'da bir lenf sistemi var mı, cinsiyetin bir önemi var mı, varsa bu farkındalığı ortaya koymaktır. Göz iç basıncının yüksekliği körlükle sonuçlanabilecek önemli bir hastalıktır. Yaklaşık 70 milyon insanda görülen glucom gibi körlüğe varan hastalıklarda uygulanabilecek tedavi yolları için bilimsel bir veri tabanı oluşturmaktır. Bu nedenle insana yakın benzer sistemin varlığını ortaya koymak, farmakolojik çalışmalarda hastalığa uygun ilaç geliştirilmesinde önemli bir veri sunmuş olunacaktır

İÇİNDEKİLER

Kodu	İçeriği	Sayfa N0
	Teşekkür	ii
	Etik Kurul Raporu	iii
	ÖZET	iv
	ABSTRACT	v
	ÇALIŞMANIN AMAÇ VE KAPSAMI	vi
1	GİRİŞ.....	1
2	MATERYAL METOD.....	10
2.3	Qdot Sentezi.....	10
2.4	Ratların temini ve anestezisi.....	11
2.5	Intraocular göz basıncının ölçülmesi ve Camera oculi anterior'a kimyasalların enjeksiyonu ve in-vivo imaging görüntülerinin alınması.	12
2.6	X-RAY radio graflerinin alınması.....	13
2.7	Micro CT kullanımı.....	13
2.8	SEM kullanımı.....	13
2.9	Elektron mikroskobunda EDX ile haritalama işlemlerin yapılması.....	14
2.10	QCM-D ile kimyasal yada fiziksel etkileşimin varlığının araştırılması..	14
2.11	Olympus BX43 Florosan Işık mikroskobu ve DP73 nolu kamera ile görüntülerinin alınması	14
3.0	BULGULAR.....	16
3.1.	İnvivo imaging görüntülerinin alınması	22
3.1.1	Indiocyanin green (ICG) erkek ve dişilerde 40.dk. 6saat sonra ve 10. saatteki çene altı görüntüleri	22
3.1.2.	Qdot 655 'in Dişi ve Erkek Rat.larda alınan görüntü örnekleri.....	24
3.1.3.	İnvivo imaging görüntülerin hesaplanması.....	27
3.1.3.1.	Erkek ratlarda görüntü alanlarının işaretlenmesi	27
3.1.3.2.	Dişi ratlarda görüntü alanların işaretlenmesi.....	28
3.1.3.3	Erkek ve Dişilerin ICG raporlarının birlikte alınması.....	29
3.1.3.4	12 nolu dişi rat'ın sağ ve sol ln. mandibulares'lerinin SYNGENE MARKA G:BOX CHEMI XRQ (Hi-LED Sistemi) deki görüntüsü.....	30

3.1.3.5	Qdot655 ile Parotis lenf bezinde İn vivo imaging görüntülerinin alınması	31
3.2	QCM 'de Qdot 655 ile Humor aquosus (HA) arasında fiziksel veya kimyasal bir etkileşim olup olmadığı ölçülmesi.....	32
3.3	Radiografik Bulgular.....	34
3.4	Micro- CT tarama	35
3.5	SEM Görüntüleri.....	36
3.5.1	Sub mandibular Lenf yumrularındaki SEM görüntüleri.....	36
3.5.1.1.	14 nolu erkek rat'ın sol ln.mandibularis'ideki normal SEM görüntüleri	36
3.5.1.2	14 nolu erkek rat'ın sol ln.mandibularis'ideki normal SEM ile EDX taraması.....	36
3.5.1.3	14 nolu erkek rat'ın sol ln.mandibularis'ideki normal SEM ile EDX ile mappingi.....	37
3.5.2.	15 nolu dişi ratın sol lenf yumrusunun normal SEM görüntüsü.....	38
3.5.2.1	15 nolu dişi ratın sol lenf yumrusunun normal SEM görüntüsü ve EDX taraması.....	38
3.5.2.2	15 nolu dişi ratın sol lenf yumrusunun normal SEM görüntüsü ve EDX ile çıkarılan mappingi.....	39
3.5.3	Schlemm kanalı ile ilgili SEM görüntüleri.....	40
3.5.3.1	4 nolu erkek rat 6 saat sonra normal SEM görüntüsü.....	40
3.5.3.1.1	4 nolu erkek rat 6 saat sonra EDX görüntüsü.....	40
3.5.3.2	14 nolu erkek rat 10 saat sonra SEM görüntüsü.....	41
3.5.3.2.1	14 nolu erkek rat 10 saat sonra SEM görüntüsü.....	41
3.5.3.3	9 nolu dişi rat 6 saat sonra SEM görüntüsü.....	42
3.5.3.3.1	9 nolu dişi rat 6 saat sonra EDX ile mappingi.....	42
3.6.	Qdot 655'in Lenf yumrularındaki Floresan ışık mikroskobu görüntüleri	43
3.6.1	Dişi sol Lenf yumrusunun cortex ve medulla kısmında görülen floresans görüntü (Qdot 655).....	43
3.6.2	Dişi sol Lenf yumrusunun cortex ve medulla kısmında görülen floresans görüntü (Qdot 655).....	43
3.6.3	Erkek sol Lenf yumrusunun cortex ve medulla kısmında görülen floresans görüntü (Qdot 655).....	44
3.6.4	Erkek sol Lenf yumrusunun cortex ve medulla kısmında görülen	

	floresans görüntü (Qdot 655).....	44
4	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	45
4.1	Ulaşılmayı düşünölen hedefler.....	50
5	KAYNAKLAR.....	51

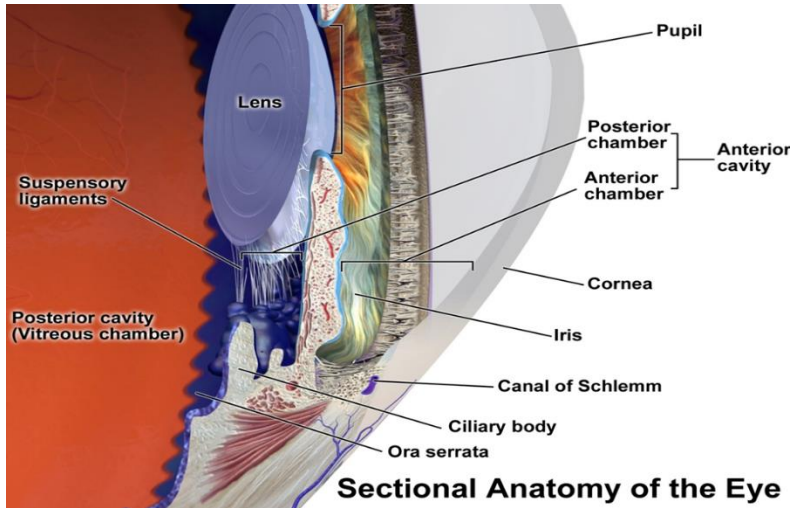
TABLO ve GRAFİKLER

	Tablo ve grafiğın adı	Sayfa No
Tablo 1.	Elde edilen bulgular genel bir tablo halinde ortaya konulmaya çalışılmıştır.....	19
Grafik 1.	Mn(II)-Katkılı ZnS Kuantum noktacıkları için öngörölen yapı ve grafiğı.....	11
Grafik 2.	Erkek ratlarda Intraocular göz basıncının (IOB) her iki gözdeki grafiğı	21
Grafik 3.	Dişı ratlarda Intraocular göz basıncının (IOB) her iki gözdeki grafiğı.....	21
Grafik 4.	Erkek-Dişı Ratlarda ICG'in 40 dk., 6 saat ve 10 saat sonra görüntü var, yok ve sonuç alınamayan görüntölere göre sayısal değlerlerin dağılım grafiğı aşağıdaki gibidir.....	23
Grafik 5.	Erkek-Dişı Ratlarda Qdot 655'in 40 dk., 6 saat ve 10 saat sonra görüntü var, yok ve sonuç alınamayan görüntölere göre sayısal değlerlerin dağılım grafiğı aşağıdaki gibidir.....	26
Grafik 6.	Her iki türe ait Sistem raporuna göre miktar tayinin hacimsel ve quantitiv değlerleri dağılımlarının grafiksel yorumu.....	30
Grafik 7.	Dişı Rat Qdot655 ile HA arasındaki etkileşim grafiğı.....	32
Grafik 8.	Erkek Rat Qdot655 ile HA arasındaki etkileşim grafiğı.....	33

1.BÖLÜM

GİRİŞ

Glokom, dünyada yaklaşık 70 milyon kişiyi etkileyen, sonunda körlüğe kadar ilerleyen önemli bir hastalıktır. 2040 yılında yaklaşık 120 milyon insanı etkileyecek şekilde hızla yaygınlaşmaktadır. Bütün tedavi göz iç basıncının artmasını ortadan kaldırmak amacına yöneliktir.

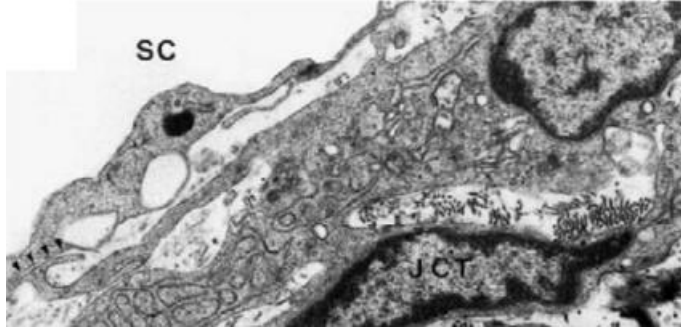


Resim 1- Gözün kesit görünümü

Klasik anatomi kaynaklarına göre, camera oculi anterior'de lenf sistemi bulunmamaktadır. Yukarıdaki resimlerde görüldüğü gibi schlemm kanalı iridoscleal aralıktan toplardamarlar aracılığı ile vv. ciliares anterior'a açıldığı görülmektedir. Vv.ciliares anteriores vv.corticosa'e'lara açılmakta, daha sonra v.ophtalmica ext. 'ya açılarak genel dolaşım sistemine katılmaktadır.

Son zamanlarda çeşitli markırlar kullanılarak yapılan araştırmalarda, insan ve koyun gözünde lenfatik bir drenajın varlığı ortaya konulmuştur. Lenf sıvısının dolaşımı lenfoid

dokulardan tahliye olduğu bilindiğine göre, gözde lenfatik dokuların varlığı ve göz drenajında rol aldığı düşünülmektedir.



Şekil -2 Schlemm kanalının iç duvarı . Trabecular Meshwork'un [JCT] juxtacanalicular dokusu. Pericytler bulunmamaktadır. [Ramos et al. Schlemm's Canal Endothelia, Lymphatic, or Blood Vasculature? J Glaucoma Volume 16, Number 4, June/July 2007]

Schlemm kanalını [SC] çevreleyen endotel hücreleri, bir kapillar damarın en iç tabakası olan endotel tabakası gibi düşünülse de ona hiç benzemez. Yaklaşık kalınlığı 400 nm kadardır. Yukarıdaki çalışmaya ait resimde görüleceği üzere Pericyt'ler tarafından da çevrelenmez.

Araştırma projemizde, gözün lenfatik drenajının tespiti için Wistar Albino ırkı erkek ve dişi Ratlar'da Qdot nokta ve ICG kullanılarak göz içine yapılacak enjeksiyonla lenfatik bir drenajın varlığının bulunup bulunmadığını, varsa hangi lenf düğümüne döküldüğünün ortaya konulması ve erkek ve dişi arasında varsa farklılığı ortaya koyma amaçlamaktadır.

Aynı zamanda, Humor aqueous'un [HA] izlediği yolu görüntülemeye çalışarak, lenfatik doku seviyesini tespit etmek, dolayısıyla göz tansiyonunu azaltmak ve glokom üzerinden körlüğü önlemek için yeni tedavi metotlarına bir bakış kazandırmayı hedeflemekteyiz. Bu çalışmanın amacı erkek ve dişi ratlarda camera oculi anterior'da bir lenf sistemi var mı, cinsiyetin bir önemi var mı, varsa bu farkındalığı ortaya koymaktır. Göz iç basıncının yüksekliği körlükle sonuçlanabilecek önemli bir hastalıktır. Milyonlarca insanı etkileyen glucom gibi körlüğe varan hastalıklarda uygulanabilecek tedavi yolları için bilimsel bir veri tabanı oluşturmaktır. Bu nedenle insana yakın benzer sistemin varlığını ortaya koymak, farmakolojik çalışmalarda hastalığa uygun ilaç geliştirilmesinde önemli bir veri sunmuş olacaktır

I-GENEL BİLGİLER

Son zamanlarda, çeşitli göz hastalıkları için anti-anjiyojenik tedavi yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, lenfagiogenesis, corneal transplantasyonunda red etmede dahil ilerleyen ocular tümörler patolojisi bakımında da önemli rol oynar. Günümüzde, çoğu göz hastalıkları, ödem, özellikle de inflamatuvar hastalıklarda lenfagiogenesis'in rolü bilinmemektedir. Gözdeki lenfatik ve lenfanjiogenesis'in daha iyi anlaşılması demek, tedavi edilemez oküler hastalıklar için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için bir temel oluşturması demektir.

Lenfatik sistem çok eskiden beri bilinmesine rağmen son dönemlerde özellikle kanser metastasları ve inflamasyon üzerine etkisi daha çok araştırılmaktadır [1,2]. Doku sistemlerinde lenfatik ağı görselleştirmek için kullanılan geleneksel yöntemler manyetik rezonans lenfanjiografi, optik lenfanjiografi ve geleneksel organik floroforlardır [3]. Lenfatik damarları in-vivo olarak görselleştirmek için organik floroforlara bağlı lenfatik endotelium spesifik belirteçlerin fluoresan görüntülemesi kullanılmıştır. Oysa Qdot ile birlikte geniş uyarılma spektrumu, dar boyuta ayarlanabilir emisyon spektrumu ve yüksek ışıkla kapanma eşiği gibi kuantum noktaların [Qdot'lar] eşsiz fiziksel özellikleri ile dokuları invaziv olmayan canlı görüntüleme için uygun hale getirir. Örneğin CdSe-ZnS çekirdek-kabuk nanoparçacıkları gibi Qdot'ların optik özellikleri canlı hücrelerin [4] ve hayvanlarda [5,6] uzun süreli tekli veya eşzamanlı çok renkli görüntüleme için avantaj sağlar. Kuantum noktaları, normal organik floresan boyadan daha büyük bir iç parlaklık nedeniyle hiperspektral görüntüleme ile tespit edilebilir [7] olması teşhis ve tedavinin lokal olmasını sağlaması bakımından önemlidir.

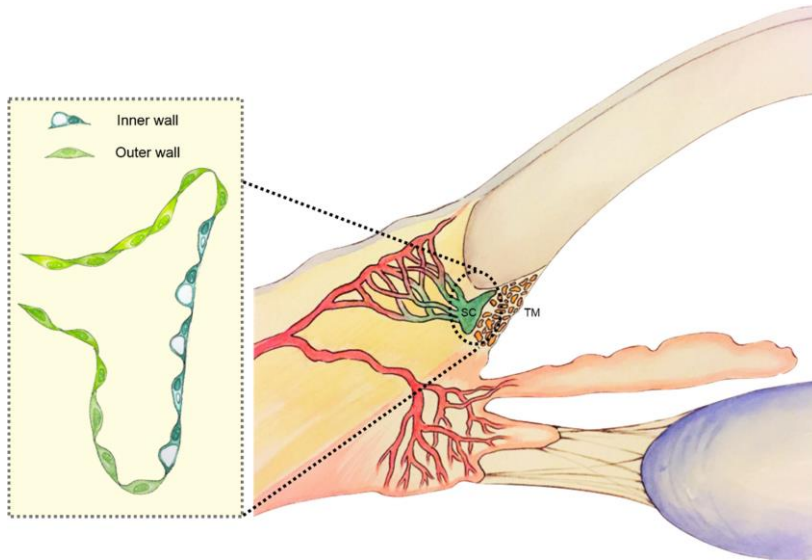
Normal kornea da ne lenf ne de kan damarı bulunmaktadır. Çünkü corneal epiteli tarafından salgılanabilir VGFR [Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF] ve inhibitör receptor [VEGFR]'nün varlığı bilinmemekteydi. Bu nedenle, bu bölgede lenf sıvısının oluşumu baskılayan çeşitli inhibitörlerin varlığı son zamanlarda açığa çıkmıştır [8,9].

Anatomik kaynaklarda gözün özellikle cornea ve m. ciliaris, iris gibi tunica vasculosa bulbi de lenf damarları hakkında bir bilgiye rastlamıyoruz. Temel olarak okutulan tüm anatomik

kaynaklarda; angulus iridocorneal aralıkda bulunan sinüs venosus sclera [Schlem kanalı] aracılığı ile humor aquosus'un plexus venosus sclera üzerinden drene edilerek v. ciliaris'e ulaşır [10,11,12].

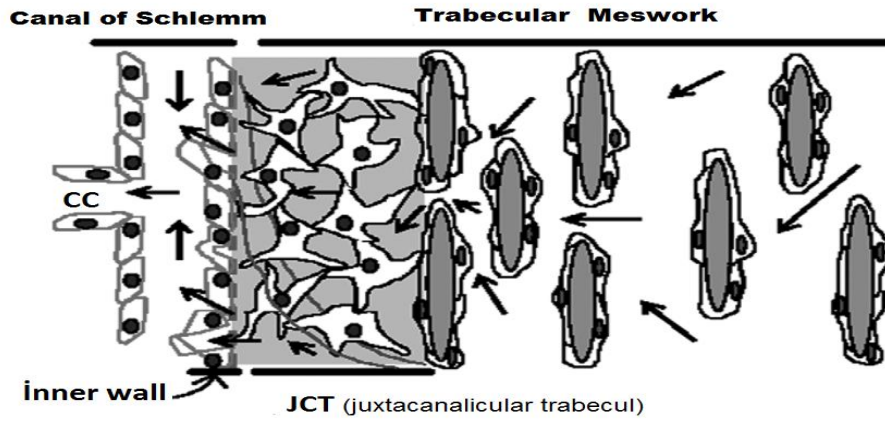
Van Buskirk [13] köpeklerde yapmış olduğu çalışmada humor aquosus, intraocular olarak yaklaşık 15-30 mm-Hg basıncı yarattığını ve bu basıncı sayesinde göz normal formunu koruduğunu belirtmektedir. Yukarıda ifade edildiği gibi Buskirk [1979] Humor aquosus, plexus venosus sclera aracılığı ile dolaşım sistemine dahil olur.

Humor aquosus'un drenajı ile ilgili yollardan biri **Convansiyonel yada Trabeküler Meshwork [TM] yoludur**. Bu yol humor aquosus'un drenaj tanımlamalarında doğrudan drenej yolu olarak tanımlanmaktadır. TM uveal ve corneoscleral meshworks tarafından oluşturulur. Bu yapılar bazal bir lamina üzerinde bulunan yassı bağ doku lamelları veya huzmelerinden şekillenir [14]. Drenajın yaklaşık 83-96'ından sorumludur.



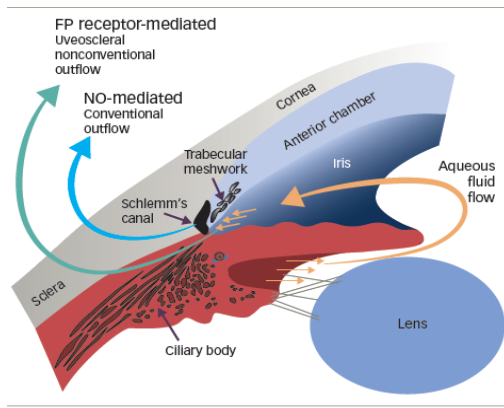
Şekil 3. Humor aquosus' un conventional drenajını gösterir şematik yapı [15]

TM'i oluşturan huzmeler HA'un,geçişine izin vermek için gözenekli bir filtre benzeri katmansal bir yapı oluştururlar. TM yapısı aynı zamanda HA'un çıkışında filtre görevi gördüğü için IOB'ın oluşumunda sağlar. GİB yeterince yüksek olduğunda, TM üzerinden Schlemm kanalına [SC] akacaktır. SC'nin lümeninde, sinomolgus [Macaca fascicularis] maymunda, HA'un sclera içinden geçen venöz sisteme boşaldığı episkleral venöz pleksusa katılan endotelial tübüllere aktığı gösterilmiştir [16].



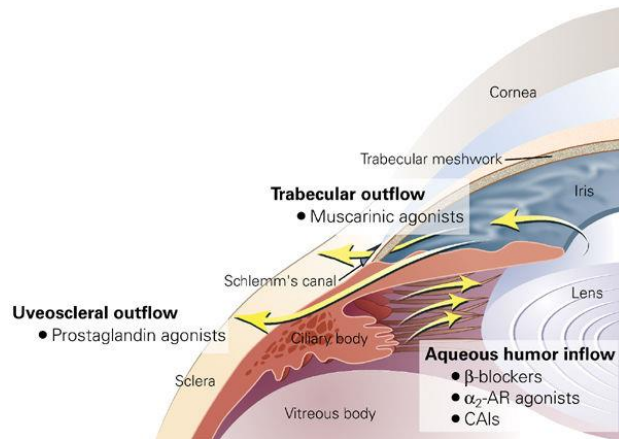
Şekil – Trabecular meshwork ve juxtacanalicular yapı [17]

Humor aquous'un drenajında görev yapan diğer yol ise **Uveoscleral** [alışılmadık] **yoldur**.



FP = prostaglandin F receptor; NO = nitric oxide.

Resim 4. Uveoscleral yol [18]



Resim 5. Uveoscleral yol. [19]

Uveoscleral [UVS] yol ; HA'un ön kameradan iris kökündeki extra cellüler aralıklarda dahil olmak üzere siliyer kas, anterior koroid kısım ve suprakoroidal alan ve skleraya bitişik olarak sıralanan ardışık bir drenaj rotasıdır [20-23] .

Daha sonra HA, sklera içinden veya penetran kan damarlarını ve sinirleri çevreleyen gevşek bağ dokusundan direkt olarak çevredeki perioküler dokulara sızır [24]. Gözü, UVS çıkış yolları üzerinden terk eden HA'un miktarı türlere göre farklılıklar gösterir : farede% 82 olduğu bildirilmiştir [25], sinomolgus maymunu gibi primatlar % 55 [26], koyunlar % 22 [27] ve kedi 3 % [28]. İnsan gözünde fluorophotometry ve tonography ile yapılan ölçümlerle HA'un akış hızı, miktarı, IOB gibi bir çok sonuçlar bildirilmiştir [29,30].

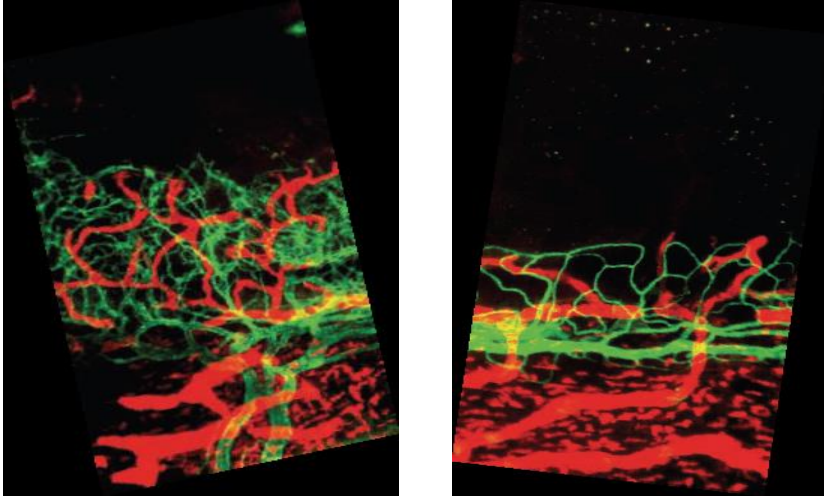
İntraocular basınç arttıkça lineer olarak da TM daki akışkanlıkta artar. Bununla beraber cyclodialysis yoluyla cilier kaslar üzerindeki basıncın kaldırıldığı durumlarda örneğin tavşanlarda Uveoscleral yolda %3 den %54'e [31], maymunlarda ise 4 kat artış [32] gözlenmiştir

Silier kasların kasılma dereceleri de Uveoscleral [UVS] drenaj üzerinde etkili olabilir [33]. Silier kaslardaki kasılma örneğin Pilocarpin ile arttırıldığı zaman UVS drenajı neredeyse tamamen bloke edildiği görülmüştür [34]. Pilocarpin ve PGF2 α ile birlikte verildiğinde, pilocarpin PGF2 α 'nın tüm etkilerini ortadan kaldırdığını tespit edilmiştir. Dolayısıyla PGF2 α 'nın siliyer kastan akışı arttırdığını düşündürmektedir [35]. Sinomolgus maymunda yapılan deneylerde PGF2 α ve PGF2 α analogu olan latanoprostun UVS çıkışını arttırdığını görülmüştür [36,37].

Vaskülarite yüzünden, korneal lenfanjenezisi incelemek için en güvenilir yöntemlerden biri, sütürle veya alkali yanıkla [NaOH çözeltisi] korneal modülasyondur [38,39]. Oysa bilindiği gibi konjuktiva, gözdeki en fazla gelişen lenfatik dokudur. Bu nedenle Glukom hastalığında, konjuktivaya damlatılan ya da sürülen ilaçların göz iç basıncına etki edebileceğini, bu nedenle hastalığın daha da artabileceği gibi, benzer şekilde göz iç basıncının düşürülmesinde de etkin yollardan biri olarak bilinmektedir [40].

Son zamanlardaki makalelerde insan gözünde camera oculi anterior'da lenfatik drenajın varlığından bahsedilmektedir [41]. Oysa Podoplanin ve diğer lenfatik markırlarla yapılan çalışmada ve immunohistokimyasal tetkiklerde gözün ön kamerasında lenf drenajının olmadığını bildirilmektedir [42]. Bunun kuvvetli delili olarak podoplaninin schlemm kanalının bütün endotelial hücrelerine etki etmesine rağmen lenf damarının varlığını ortaya koyamamış olmasıdır [43].

Gözdeki lenfaiogenesis mekanizması kısmen anjiogeneze benzetilebilir. Çünkü Lenfatik endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu önemli ölçüde uyaran IGF-1 ve IGF-2, kornea lenfajiyogenesis indükleyebildiği ortaya konulmuştur [44].



Resim 6. Podoplanin veya LYVE-1 kullanılarak insan corpus ciliaris'te görülen lenfatik damarlar. [lymphangiogenic [LYVE-1, red] endothelium and angiogenic (green)]

Fare korneasında yapılan bir çalışmada kan damarlarının bulunmadığı ancak lenfatik fizyolojik sistemin yani lenfajiyogenesisin bağımsız olarak oluşabileceği fikri ileri sürüldü [45]. İnsan korneasında embriyolojik gelişme sırasında lenfatik damar bulunmadığı bilinmektedir. Çünkü korneanın vaskülarizasyonu görme keskinliğini bozarken, ayrıca kornea lenfajiyogenesis yapamaz kabul edildi. [46]

Retrobulbar alana kolloid solüsyon veya Hindistan mürekkebi enjekte edildiğinde mürekkebin lenfatik damarlara veya lenf noduna ulaşp ulaşmadığı üzerine yapılan araştırmada bölgede hiçbir lenfatik damar tespit edilemedi ve lenfatik damarlara veya lenf noduna yol açmadığı sonucuna varıldı [47].

Bu gözlemlerden sonra insanlarda da benzer olarak lenfatik damarlardan yoksun olduğu düşünüldü [48]. Bununla birlikte 1993'te, maymunda, orbital araknoid, lakrimal bez, ekstraoküler kas ve orbita'nın apeksindeki bağ dokuda lenfatik damarların varlığı ortaya konuldu [49]. Bu nedenle gözdeki tansiyonun araştırılmasında Qdot nanopartiküllerin önemi çok artmıştır. Nanopartikül [NPs] ve Qdot etkileşmesi ile yeni nanokompozit oluşumu son zamanlarda oldukça önemli araştırma konusu olmuş, özellikle fonksiyonel grupların bağlanması ile daha da etkin hale getirilmiş nanokompozitler, biyomedikal alanlarda, yüzey geliştirilmiş Raman, elektronik materyal, kataliz vb. alanlarda geniş uygulama alanı bulmuştur.

Bu çalışma kapsamında, ilk başta suda çözünebilir Mn:ZnS Qdot sentezi literatüre göre gerçekleştirilecektir [46]. Bu kuantum nokta seçiminin sebebi özellikle uzun ömürlü floresansa sahip olabilmesi ve hücre içi herhangi bir toksite vermemesidir. Bu nedenle bu Qdot olarak Mn:ZnS seçimi oldukça önemli ve avantajlıdır. Uzun süreli floresansa sahip olması çalışmanın seyri içerisinde avantajdır.

Bu nedenle gözdeki tansiyonun araştırılmasında QD nanopartiküllerin önemi çok artmıştır. Kuantum dot [noktaları-benekleri], floresan ışık ile yakalanabilen 1 nm ila 10 nm arasında değişen yarı iletken nanoparçacıklardır [50,51]. Partikül boyutuna göre, daha kısa dalga boyları yayan küçük parçacıklar ve daha uzun dalga boyları yayan daha büyük partiküller ile etkileşerek değişik renk verir [50,51].

Qdot'lar yarı iletkenler bir iletim bandı, bir bant aralığı ve bir değerlik bandı içerir. Bu üç bileşenin etkileşimi, kuantum noktasının optik özelliklerini verir. Bir elektronun değerlik bandından, iletim bandına sıçramasına neden olmak için sisteme yeterli enerji ilave edildiğinde, kuantum noktalar bir fotonu emerler [52]. Bu, elektronun başlangıçta bulunduğu değerlik bandında bir delik [açıklık] bırakır ve dolayısıyla elektron-delik çifti üretilir [53]. Bunun sonucu olarak da bir foton veya ışık yayılır [54]. QD'lerin optik özellikleri açısından CdSe-ZnS çekirdek-kabuk nano parçacıkları sayesinde gerek canlı hücrelerin [55] gerekse hayvanların [56,57] uzun süreli tekli veya eşzamanlı olarak çok renkli görüntüleme için avantajlıdır. Bu nedenle Qdot'lar, normal organik floresan boyalardan daha büyük bir iç parlaklık özellikleri nedeniyle nedeniyle hiperspektral görüntülemeye tercih edilirler [58].

Mn/ZnS kuantum nokta [Qdot] temelli optiksel ve magnetiksel olarak görüntülenebilir ve hedeflenebilir hücre içi ilaç salımındaki olaylarda raporlama yeteneğine sahip Qdot nanokristalleri yağ ve su karışımında mikroemülsiyon metoduna göre sentezlenecektir [59]. Bunun için, Mn[CH₃COO]₂, Na₂S ve Zn[CH₃COO]₂ sulu standard çözeltileri kullanılacaktır. Qdot Çekirdek/kabuk Mn: ZnS'ye sahip Kuantum Qdot585 [Invitrogen, Eugene, OR, ABD], 585 nm'de maksimum emisyonla birlikte elipsoid bir maddedir [60].

Literatürde in-vio görüntüleme için yapılan araştırmada sol göz içine yapılan enjeksiyonlardan 5, 20, 40 dk ve 2, 6, 24 saat sonrasında yapılan görüntülemeye boyun

bölgesinde Qdot'ın sinyal verdiği sonra sol submandibular lenf yumrusunda sinyalizasyon görülmesi ile gözde bir lenf drenajının varlığı hakkında ilk ve en önemli bulgudur [61].

Benzer şekilde insan ve koyun gözünde de yapılan çalışmada, Lenfatik gözünde lenfatik drenajının varlığı ortaya konuldu [62,63]. Çoğu organda hücre dışı sıvıları, çözünen maddeleri ve proteinleri boşalttığı bilinen kanallardır. Lenfatik muhtemelen gözlerden sıvı drenajına katkıda bulunur ve lenfatik akışın in-vivo görüntülenmesi için yöntemler geliştirilmesi, glokom çalışmalarıyla oldukça ilişkili olabilir.

2.BÖLÜM

MATERYAL METOD

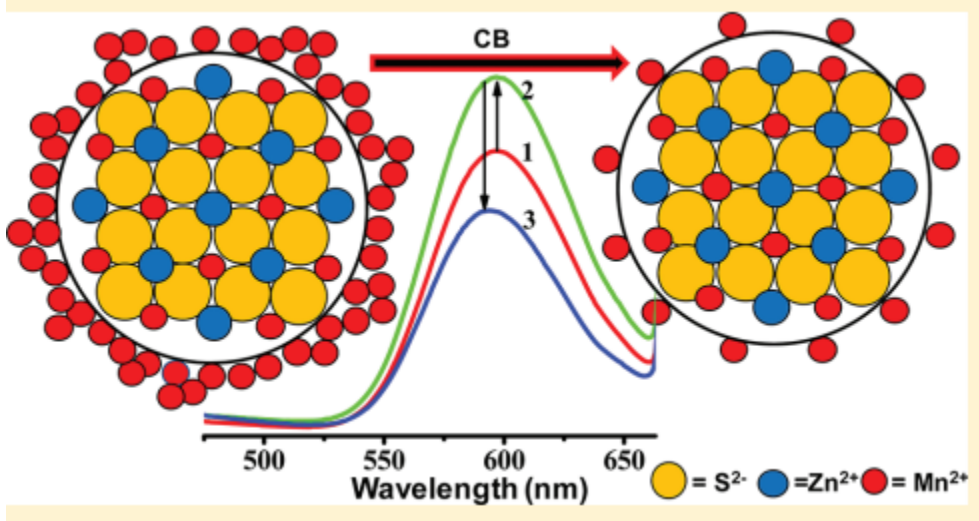
2.1 Etik kurul Raporu:

ERÜ. Hayvan Deneyleri Etik Kurulu [EÜHADYЕК] ‘nun 15.03.2017 tarih, Toplantı Sayısı: 03 Karar No:171026 ile gerekli izin alındı.

2.2 Materyal

2.3 Qdot Sentezi:

Mn-Katkılı ZnS Kuantum Nokta Sentezlenmesine çalışıldı. Bu amaçla suda çözünabilir Mn:ZnS Qdots sentezi, hava ortamında sulu çözeltide sabitleyici olarak tiyoglikolik asit kullanıldı. Deneylerde sulu çözelti olarak [0,1 M] $Zn[CH_3COO]_2 \cdot 2H_2O$, $Mn[CH_3COO]_2 \cdot 2H_2O$, ve Na₂S taze olarak hazırlandı. Zn[II] ve Mn[II] çözeltileri [%0, 1, 1,5, 2, 2,5, ve 3 Mn[II]], sonikatörde karıştırma esnasında uygun miktarda tiyoglikolik asit ilavesi yapıldı. Ortam pH’sı 4,5’a ayarlandıktan sonra, 0,1 M Na₂S çözeltisi uygun miktarda hızlı bir şekilde ortama ilave edildi. Reaksiyon karışımı 2 saat süreyle 80°C’da ısıtıldı. Karakterizasyon için, taramalı elektron mikroskobu [SEM], EDX analizi, kuartz kristal mikroterazi [QCM], atomik kuvvet mikroskobu ile yüzey analizi, Raman, FT-IR, parçacık boyut ölçümü [dinamik ışık saçılımı], zeta potansiyel ölçümü [Zetaziser], UV-VIS spektrometre ile tarama analizi kullanıldı.



Grafik 1. Mn(II)-Katkılı ZnS Kuantum noktacıkları için öngörülen yapı ve grafiği

Sentez ve karakterizasyon gerçekleştirilmesine rağmen Çalışma materyalimiz olan Wistar albino ratlar yapılan ön çalışmalarda floresan elde edilemedi. Çünkü Çalışılan ratlardaki doku yüzey elektriği ile sentezi yapılan nanopartükülün yüzey elektrik yüklerindeki uyumsuzluk bir yana Çekirdek / kabuk Mn-ZnS'ye sahip Kuantum noktaları QD585 nm'de maksimum emisyonu sahip bir kuantum nokta yapı olduğu için emisyon olarak farenin cilt kalınlığı, bağdoku ipliklerinin güçlü olması, izlenmesi düşünülen mandibular lenf yumrusunun derinlerde olması nedeniyle sol gözler için daha güçlü emisyonu sahip Qdot655 ITK Carboxyl [Invitrogen] ile sağ gözler için fizyolojik su ile sulandırılmış İndiocyenin Green [ICG] kullanıldı. ICG yaklaşık 780 nm ile 830 nm arasında emisyon veren toksik olmayan bir floresan boyasıdır.

2.4 Ratların temini ve anestezisi

Erciyes Üniversitesi [ERÜ] Dekan araştırma merkezinde yetiştirilen ağırlıkları yaklaşık 250-300 g arasında değişen 8-9 haftalık 16 adet dişi 16 adet erkek Wistar albino rat kullanıldı. Sürekli 12 saat ışık /karanlık döngüler altında kafeslerine yerleştirilmiş olarak tutuldu ve deneyler öncesinde de dahil olmak üzere, standart yiyecek ve su ile ad libitum sağlandı.

Ratlar İP ile genel anestezide alındı. Bu amaçla Erkekler için : 0.3 mL [0.6 mL Xylazin, 0.24 mL Ketamin], Dişiler için : 0.2 mL [0.6 mL Xylazin, 0.14 mL Ketamin] kullanıldı.

Baş, boyun bölgesi hafifçe tıraş edildi ve tüy dökücüler kullanılarak tüyler uzaklaştırıldı.

In-vivo görüntüleme için, gözlerin nemli kalmasını sağlamak amacıyla [n = 14] denemeden 17 saat önce ve deneyin başlamasından 1 saat önce, üç damla yapay göz damlası topikal olarak uygulandı.

%0.5 Steril Oftalmik Solüsyon, 15mL [1 mL'de 5 mg Proparakain HCl] göz damlasından her iki göze birer damla damlatıldı. Damlatıldıktan hemen sonra Tonopen XL ile her iki gözde ölçüm yapıldı. Heriki gözde tonometre uygulaması korneanın merkezine dik olarak yapıldı. Kararlı ardışık ölçüm elde edilinceye kadar [altı kez] çoklu okumalar yapıldı, bu altı ölçümün ortalama değeri kayıt altına alındı.

2.5 Intraocular göz basıncının ölçülmesi ve Camera oculi anterior'a kimyasalların enjeksiyonu, in vivo imaging görüntülerinin alınması.

Intra ocular göz basıncı [IOB] ölçümü yapıldıktan hemen sonra 1-3 μ L 3-4 dk içinde sol gözün ön kamerasına Qdot 655 [Quantum dots [QD655, Invitrogen, Eugene, OR, USA] with core/shell CdSe/ZnS, are ellipsoid [6 nm $\times$ 12 nm], with maximal emission at 655 nm. QDs were coated with carboxylic acids and negatively charged [QD-COOH, pH 9.0]. 1.25 μ L of 8 μ M solution in a 50 mM borate buffer was injected.] ile sağ ön kamerasına ise ¼ oranında serum fizyolojik ile sulandırılmış ICG [indiocyanin green] enjekte edildi.

Gözün ön kamera içi enjeksiyon için 33- gauge needle [Hamilton Company, Reno, NV] ve Hamilton syringe [Hamilton Company] kullanıldı. Qdot655 için yaklaşık 1.25 μ L, ICG için ise erkekler için 1.00 μ L ile 1.50 μ L arasında enjeksiyon yapıldı.

In-vivo görüntü alınması amacıyla Syngene GBOX, XRQ cihazı kullanıldı. Qdot 655 için Epimid wave 655nm emisyon filtresi, ICG için ise LY 800 nm filtresi kullanıldı. Tarama süresi 720 ile 900 ms arasında uygulandı. Görüntüler otomatik olarak alındı. Görüntülerin işlenmesi ve gerekli raporların alınması için Syngene tools yazılım programı kullanıldı.

2.6 X-RAY radiografilerinin alınması

Ratların invivo imajin görüntüleri alındıktan sonra Veteriner Fakültesi kliniklerinde kullanılan X-Ray cihazında radyografileri alındı.

2.7 Micro Computer Tomografi kullanılması

Genel anestezi altında, Intracameral enjeksiyondan 40-50 dakika ve 6 saat sonrasında ratların [n = 16 dişi ve 16 erkek] in-vivo hiperspektral görüntüleme alındıktan sonra ötenazileri yapıldı. Ratların gövdesinin üst yarımı kollarının hemen hizasında olympus diseksiyon mikroskobu altında uzaklaştırılarak High Resolution Desk-Top Micro-CT [Skyscan 1172] ile görüntülemeleri alındı.

2.8 Scan Electron Mikroskobun kullanımı

Elektron mikroskop inceleme ve otopsi bulguları için ise ratlar, Micro- CT de tarama yapıldıktan sonra ötenazi edilen ve gövdesinin üst yarımı ayrılmış olan ratlar, Veteriner fakültesindeki anatomi anabilim dalında bulunan diseksiyon mikroskobu [Olympus] altında bulbus oculileri ekstirpe edildi. Örnekler, 4°C'de 48 saat boyunca %4 paraformaldehit içine daldırıldı.

Elde edilen numunelerin diseksiyon mikroskobu [Olympus] altında hem cornea kısmında hemde n.opticus seviyesinde takke gibi bir parça çıkarıldı. Göz küresinin arkasında açılan pencereden lens dikkatlice uzaklaştırıldı. Daha sonra gözler 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içinde yıkandıktan sonra %2,5 gluteraldehit solüsyonu içinde 6 saat kadar bekletildi, daha sonra tekrar 0,1 M pH 7,4 fosfat tamponu içinde yıkandı, ikinci yıkamayı takiben %1 Osmium tetroksit içinde 1 saat bekletildikten sonra sırayla %25, 50 ve 75'lik aseton solüsyonunda 10'ar dakika yıkandıktan sonra, en son aşama olarak da %100'lük asetonla son kez yıkandı. Yıkama işlemi yapıldıktan sonra diseksiyon mikroskobu altında gözler antero-posterior yönde dilimlere ayrıldı.

Ötenazisi işlemi gerçekleştirildikten sonra boyun bölgesi diseksiyonla açılarak mandibular lenf yumruları makroskopik olarak diseke edildikten sonra scan elektron mikroskobik görüntüsünü almak için gözdeki gibi tespit işlemleri takip edildi.

Son aşama olarak kritik nokta kurutulma işlemi gerçekleştirildikten sonra numuneler altın ile kaplanarak scan electron mikroskopta görüntüleri alındı.

2.9 Elektron mikroskobunda EDX ile haritalama işlemlerinin yapılması

Hem gözdeki schlemm kanalının tespiti hemde nano partiküllerin bir araya gelerek görüntülenebilir form oluşturup oluşturmadığı , hemde kullanılan nano partikülün hangi yapısının gerek göz gerekse lenf yumrusuna tutunarak floresans verdiğini tespiti amacıyla EDX leri alınarak haritalama işlemleri yapıldı.

2.10 QCM-D ile kimyasal etkileşimin varlığının araştırılması

Kullanılan Qdot655 humor aqueous ile arasında ya fiziksel yada kimyasal herhangi bir etkileşim içinde bulunup bulunulmadığına da QCM cihazında bakılarak tespitin çalışıldı.



Resim 7. QCM-D cihazı

2.11 Olympus BX43 Floresan Işık mikroskobu ve DP73 nolu kamera ile görüntülerinin alınması

Qdot655'in lenf yumrusunda varlığını ortaya koyma amaçlı olarak diseke edilen lenf yumrusu diseksiyon mikroskobu altında ince dilimlere ayrılarak olympus BX43 nolu floresan ışık mikroskobunda yaydığı floresan yoluyla varlığını ortaya koyma amaçlandı. DP73 kamera kullanılarak alınmaya çalışıldı.



Resim 8. Olympus BX43 Floresan ışık mikroskobu

3.BÖLÜM

BULGULAR

Ülkemizde ilk olarak laboratuvar hayvanlarında invivo imaging görüntüleme sistemlerinin kullanılması bu çalışma ile başlamıştır.

Araştırmamızda yarı manyetik Mn-ZnS analizi kullanılacaktı. Araştırma fonuna sunduğumuz gerekçeli raporumuzda da görüleceği üzere sentezini yapmaya çalıştığımız nanopartikülün yüzey yükleri ile göz dokusu arasındaki uyumun tam olarak sağlanamadığı ve emisyon gücünün QD585 nm'de olması çalışma materyalimizin oldukça büyük olması, deri kalınlığını aşmadaki zorluğunu ortaya çıkartmıştır. Bu nedenle emisyon gücü daha yüksek olması nedeniyle CdSe çekirdeğinin etrafında semikondüktör olarak ZnS ile kaplanmış bir nanopartikül olan Qdot™ 655 ITK™ Carboxyl kullanılmıştır.

Bu araştırma da dünyada yapılan çalışmalardan farklı olarak bir çok analiz ve değerlendirme söz konusudur.

A- Literatür verilerine göre daha önce yürütülen çalışmalarda;

A.1 Yaklaşık 20-30 gr. ağırlığında oldukça küçük deney farelerinin kullanıldığı, çalışma materyallerinde glukom tedavisinde kullanılan, lenfatik sisteme duyarlı prostoglandin türevi olan latanoprost ile Qdot655 birlikte kullanıldığı ,

A.2 Mandibular lenf yumrusunda kullanılan nanopartikülün varlığını ortaya koymak amacıyla floresan boya ile boyanması ile mikroskopik görüntüsü alındığı,

A.3 Büyük hayvan olarak koyunlarda radyoaktifli iyot125 Bovin Serum Albumin'i camera oculi anterior'a enjeksiyon sonucunda radyo aktif maddenin, submandibular, retropharyngeal, cervical hatta preauricular lenf nodullerinde de ölçümü yapıldığı,

A.4 Schlemm kanalının yapısı hakkında LYVE-1, VEGF-2, VEGF-3 gibi proteinlerin marker olarak kullanıldığı,

A.5 Çalışmalarında Cryo-immunogold electron microscopy'den faydalandığı belirlenmiştir.

B- ERÜ. Araştırma fonunu desteklediği çalışmamızda ise yukarıda özetlenen metotlardan, önemli farklı olarak:

B.1 250-350 gr. 8 haftalık Wistar Albino Rat kullanılmıştır. İn-vivo imaging görüntü almada oldukça riskli bir büyüklüğe sahip bir hayvan modelidir. Çünkü Lenf yumrusunun bulunduğu derinlik, üzerine örten güçlü ve kalın bağdoku, yağ kitlesi ve derinin kalınlığı üst üste bindiğinde floresans görüntüyü almayı zorlaştıran ciddi faktörlerdir.

B.2 Humor Aquous ile kullanılan Qdot655 arasında herhangi fiziksel yada kimyasal bir reaksiyon olup olmadığı kuartz kristal mikroterazi [QCM-D] ile incelenmiştir.

B.3 Scan elektron mikroskopik görüntülemeye Qdot'ın gerek trabeküler meshwork'de gerekse schlemm kanalında görüntüsü saptanabilmiştir. Ayrıca kullanılan nanopartikülün EDX ile mappingi alınmıştır. Nanopartikülün hangi tabakasının doku yüzeyine tutunduğu tespit edilmiştir.

B.4 Mandibular lenf yumrusunun scan elektron mikroskop görüntüsünde de hem Qdot655'in varlığı ortaya konulmuş hem de hangi katmanının tutunduğu EDX'i ile mappingi çıkarılarak belirlenmiştir.

B.5 Gerek erkek gerekse dişi ratlarda Qdot655' in mandibular lenf yumrusunda floresan görüntüsü alındıktan sonra High Resolution Desk-Top Micro- CT [Skyscan 1172] taraması yapılmasıdır.

B.6 Qdot655'kullanılmış ratların X-Ray görüntüleri alınmıştır.

B.7 ICG ile Qdot655'in ilk kez karşılaştırmalı olarak in-vivo imaging görüntüleri alınmış ve raporlamaları yapılmıştır.

B.8 Araştırmada Indiocyenin green [ICG] boyasının hem shclemm kanalındaki seyri hemde komparatif olarak Qdot655 ile karşılaştırmalı olarak kullanılmasıdır. Icg nin hem 780 nm emisyon gücüne sahip olması hemde toksik olmaması çalışmada tercih edilmesinin önemli nedenidir

.

Tablo 1. Elde edilen bulgular genel bir tablo halinde ortaya konulmaya çalışılmıştır

No	IOB /mmHg Tonopen XL Sol göz/Sağ göz		ICG miktarı μL Sağ göz		Qdot miktarı μL Sol göz		ICG Ln.mandibulare Görüntü								Qdot Ln.mandibulare Görüntü							
	E	D	E	D	E	D	15 [E]	15 [D]	40 [E]	40 [D]	6 [E]	6 [D]	10 [E]	10 [D]	15 [E]	15 [D]	40 [E]	40 [D]	6 [E]	6 [D]	10 [E]	10 [D]
1	26/24	21/20	1.25	1.25	1.00	1.25	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	24/24	17/18	1.25	1.25	1.00	1.25	-	-	-	-	-	+	-	*	-	-	-	-	-	+	-	+
3	26/27	20/21	1.25	1.25	1.00	1.25	-	-	-	-	+	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	23/24	16/17	1.00	1.25	1.50	1.25	-	-	-	-	+	+	*	*	-	-	-	-	-	-	*	-
5	26/26	26/27	1.00	1.25	1.50	1.25	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	*
6	16/15	14/15	1.00	1.25	1.00	1.25	-	-	-	+	+	+	*	*	-	-	-	-	+	-	-	*
7	18/19	26/24	1.25	1.25	1.20	1.25	-	-	-	-	+	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	+
8	24/26	26/30	1.25	1.25	1.20	1.25	-	-	+	-	+	-	*	*	-	-	+	-	+	-	-	-
9	24/26	25/29	1.50	1.25	1.50	1.25	-	-	-	-	-	+	*	*	-	-	-	-	+	+	*	*
10	18/17	20/23	1.50	1.25	1.50	1.25	-	-	-	-	-	+	*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	15/15	20/21	1.25	1.25	1.50	1.25	-	-	-	-	+	+	*	+	-	-	-	-	+	-	*	-
12	17/17	24/25	1.25	1.25	1,50	1.25	-	-	-	-	+	+	*	*	-	-	-	+	-	+	*	*
13	19/17	26/26	1.25	1.25	1.50	1.25	-	-	-	-	+	-	*	-	-	-	+	-	+	-	+	-
14	14/13	28/29	1.00	1.25	1.80	1.25	-	-	-	-	+	+	*	+	-	-	-	+	+	-	-	+
15	17/16	22/24	1.00	1.25	1.50	1.25	-	-	-	-	+	+	*	+	-	-	-	-	-	-	-	+
16	17/15	27/27	1.00	1.25	1.50	1.25	-	-	+	-	+	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 1.de aşağıda numaraları verilen ratlar rast gele seçilmiş olup 10.saatte de ölçümleri yapılmıştır.

Uygulanan IP anestezi dozu E: 0.3 mL [0.6 mL Xylazin, 0.24 mL Ketalar], D: 0.2 mL [0.6 mL Xylazin, 0.14 mL Ketalar]

*:Ölçüme yapılmadı

ICG için: 5 ve 7 numaralı hayvanlarda erkekler için 10 saat sonra kontrol amaçlı ölçüm yapıldı, 5 nolu erkek hayvanda 6 saat sonrasında görüntü yokken 10. Saatte hafif görüntü alındı.

5 nolu dişide hem 6. hemde 10. saatte görüntü elde edildi.

7nolu erkek ratta 6 saatte hemde 10. aaatte görüntü alındı

7 nolu dişi ratta görüntü alınmadı, diğerlerinde de kontrole gerek duyulmadı.

Qdot için : 2,7, 13 ve 15 numaralı hayvanlar için kontrol amaçlı ölçümde:

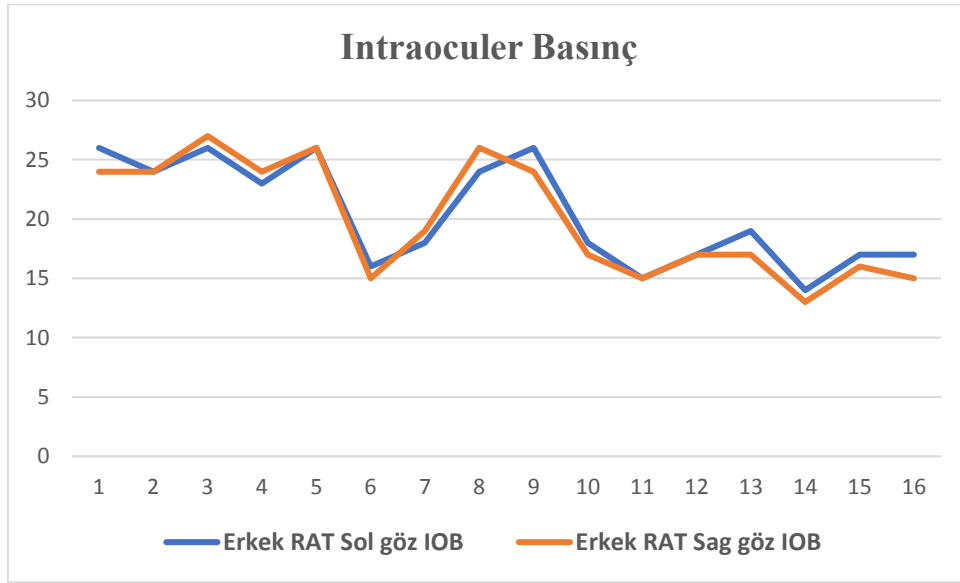
2 nolu dişi ratta, görüntü alınırken , 2 nolu erkek 10.saatte ratta görüntü alınmadı

7 nolu dişi ratta 6 saat sonrasında görüntü alınmazken, 10.saate görüntü alındı, 7 nolu erkek hem 6. Saatte hemde 10.saate görüntü alınmadı

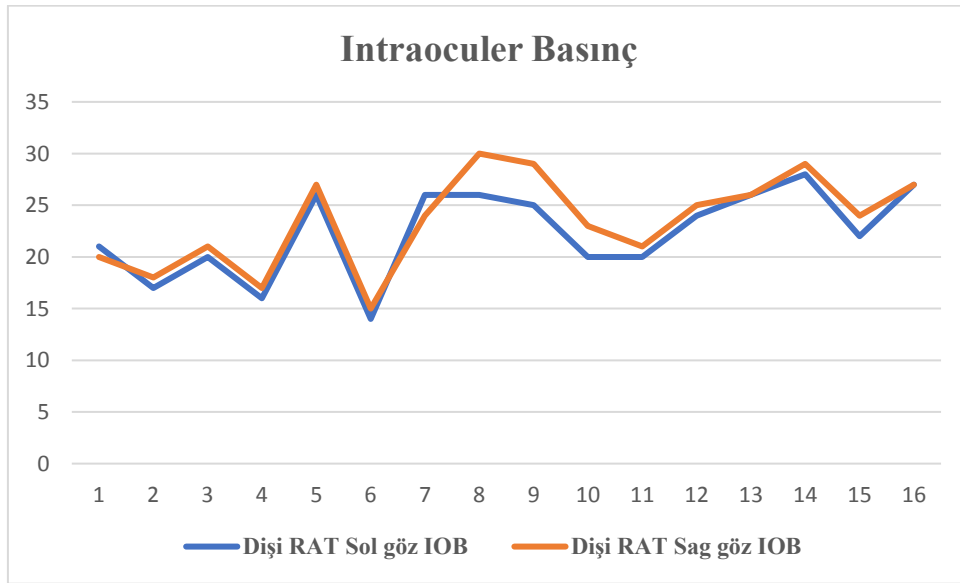
13 nolu erkek ratta hem 6.saate hemde 10.saate görüntü alındı..13 nolu dişi ratta ise hem 6. Saatte hemde 10. saatte görüntü alınmadı

15 nolu dişi ratta. 6. Saatte görüntü alınamazken 10. saatte alındı.15 nolu erkek ratta ise hem 6.saatte hemde 10. Saate görüntü alınmadı.

Grafik 2. Erkek ratlarda Intraocular göz basıncının [IOB] her iki gözdeki grafiği



Grafik 3. Dişi ratlarda Intraocular göz basıncının [IOB] her iki gözdeki grafiği



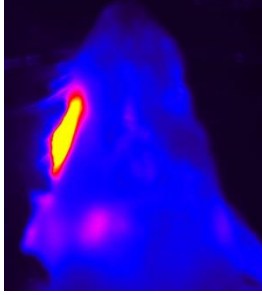
Yukarıdaki her iki tabloda görüleceği üzere erkek ve dişi ratların arasında önemli bir fark bulunmamaktadır.

3.1 İN-VİVO İMAGING GÖRÜNTÜLERİN ALINMASI

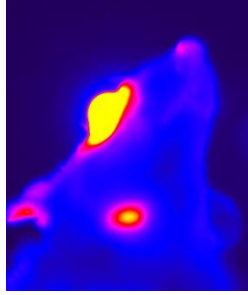
İn-vivo görüntü alınması amacıyla SYNGENE MARKA G:BOX CHEMI XRQ [Hi-LED System] Manuel Band Görüntüleme Sistemi kullanıldı. Elde edilen görüntüler Syngene tools programında analizleri yapılarak raporlandırıldı.

3.1.1 Indiocyanin Green [ICG] erkek ve dişilerde 40.dk. 6saat sonra ve 10.saatteki çene altı görüntüleri

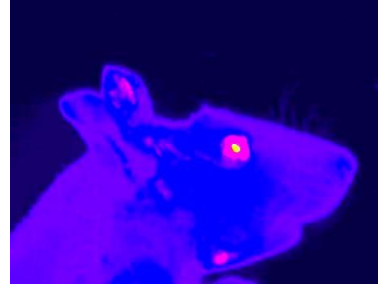
A- Dişi Ratlar



40. dk sonra çene altı
Görüntüsü

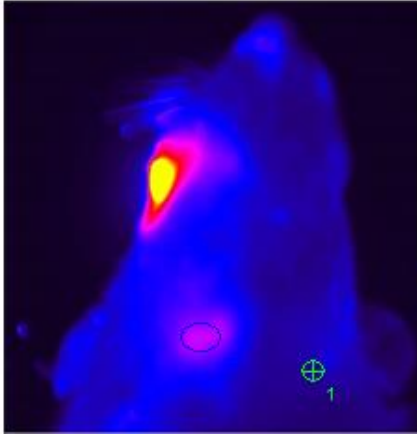


6 saat sonra çene altı
Görüntüsü

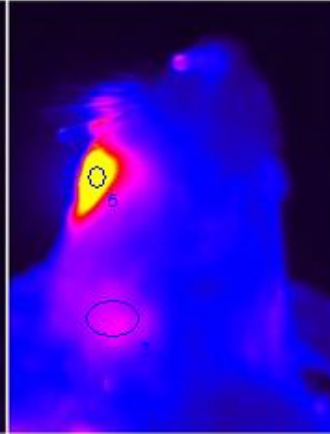


10 saat sonra çene altı
Görüntüsü

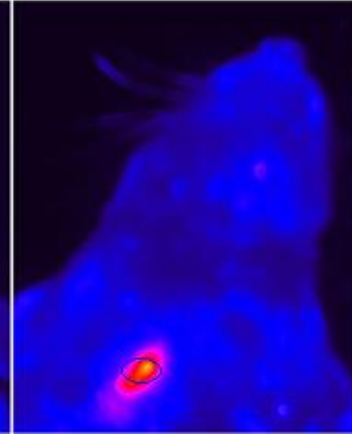
B- Erkek Ratlar



40. dk sonra çene altı
Görüntüsü



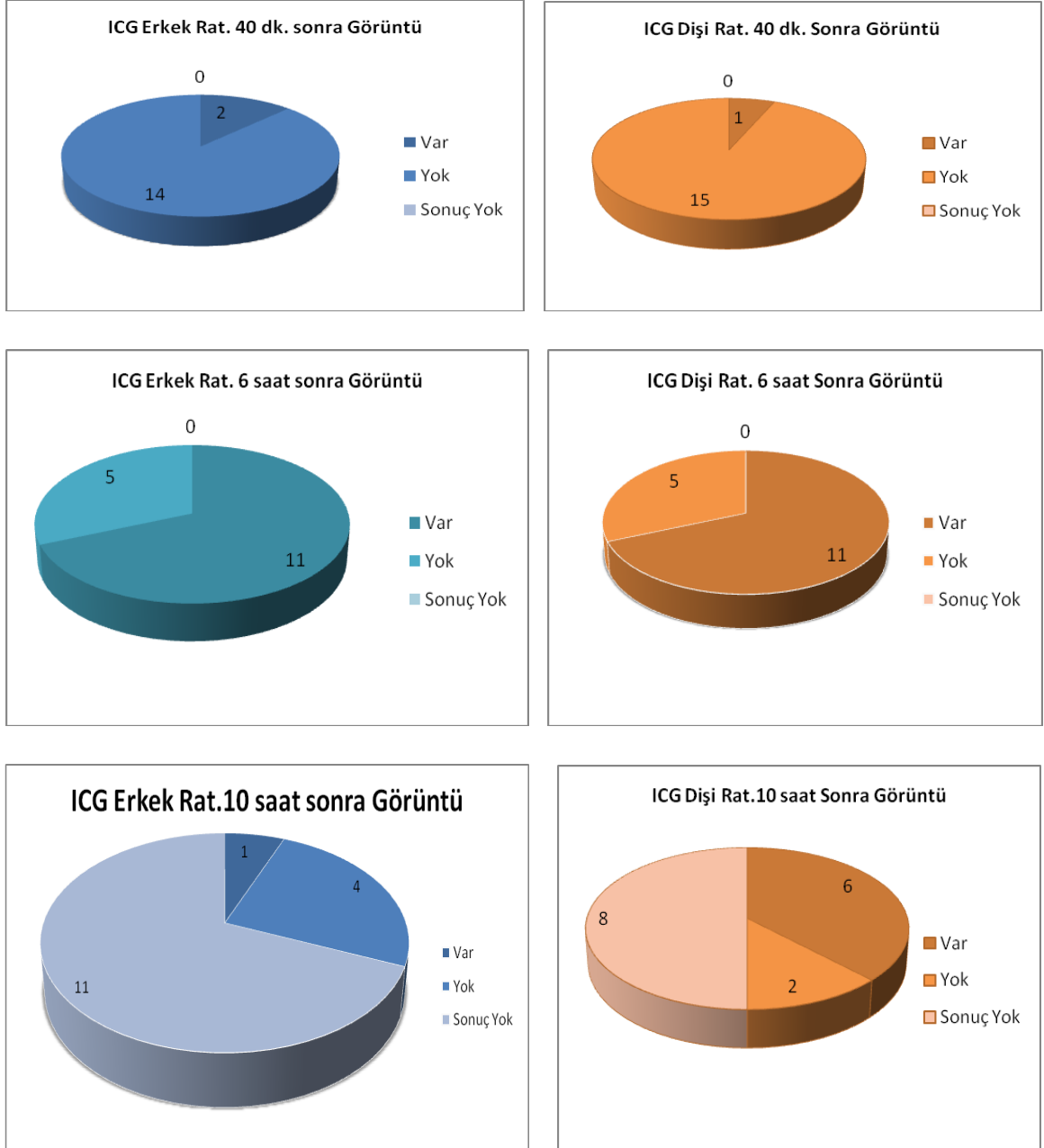
6 saat sonra çene altı
Görüntüsü



10 saat sonra çene altı
Görüntüsü

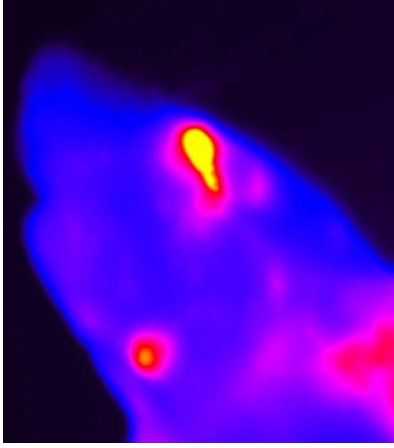
Grafik 4. Erkek-Dişi Ratlarda ICG'in 40 dk., 6 saat ve 10 saat sonra görüntü var, yok ve sonuç alınamayan görüntülere göre sayısal değerlerin dağılım grafiği aşağıdaki gibidir.

ICG;

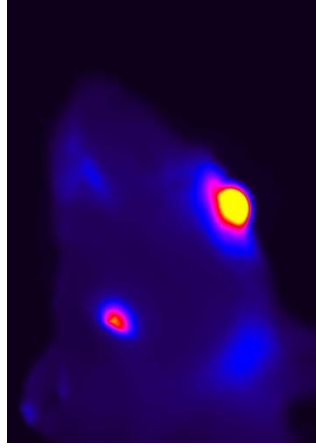


3.1.2. Qdot 655 'in Dişi ve Erkek Rat.larda alınan görüntü örnekleri;

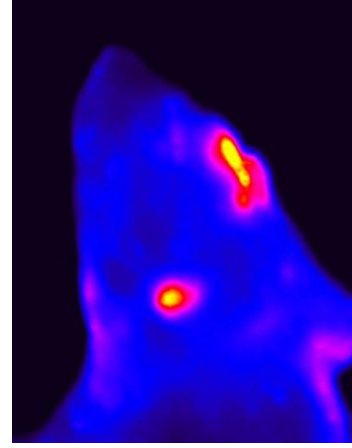
A-Dişi Ratlar.



40. dk sonra çene altı
Görüntüsü



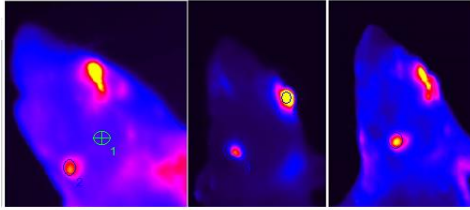
6 saat sonra çene altı
Görüntüsü



10 saat sonra çene altı
Görüntüsü

Image document data

File: C:\Users\SYNGENE\Desktop\qdot655in mandibularis 40. 05aat 100 saat sonra.jpg
Created by: Erçiyes
User ID:
Generated on: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:52:49
ID: 1521627812
Template file:



Black:0 White:255 Gamma:1.00

Properties

User Field 1
User Field 2
User Field 3
User Field 4
User Field 5

Capture: GLP warning: This image was created from a non GLP source
Digitizer: Settings
Source file: C:\Users\SYNGENE\Desktop\qdot655in mandibularis 40. 05aat 100 saat sonra.jpg

Document history

Date: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:54:03
Author: Erçiyes

Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	19374.00	100.00
Spot 2	64689.00	333.90
Spot 3	45112.00	232.82
Spot 4	61782.00	318.94
Spot 5	28479.00	147.00

Quantity calibration details

User: Erçiyes Created: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:54:03 ID: 1073424843
Signature: Printed: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:54:03 : Page 1

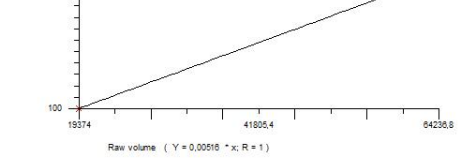
Curve type

Linear through origin (single standard value)

Units

ng

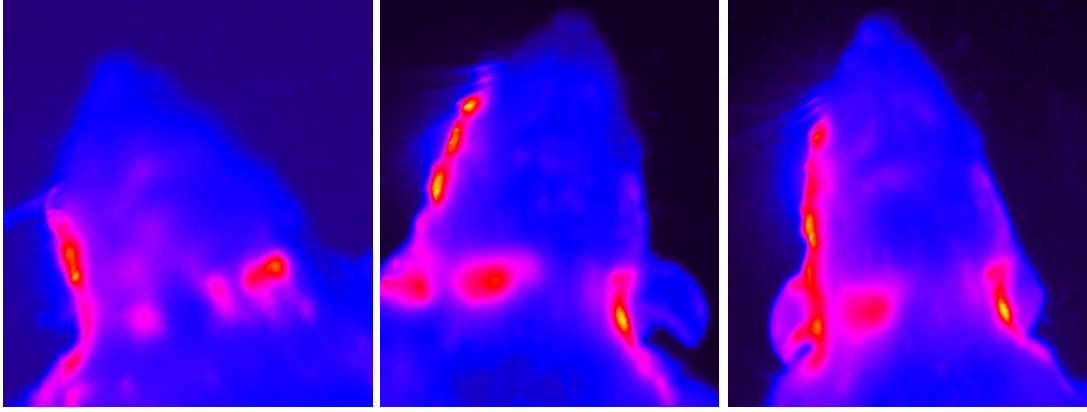
Calibrated quantity - ng



Spot	Raw vol.	Assigned quantity
1	19374.0	100.0

User: Erçiyes Created: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:54:03 ID: 1073424843
Signature: Printed: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:54:03 : Page 2

B-Erkek Ratlar



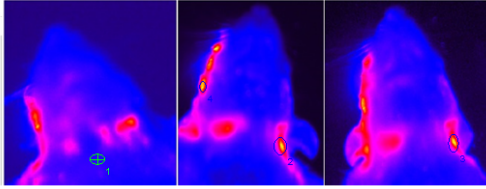
40. dk sonra çene altı
Görüntüsü

6 saat sonra çene altı
Görüntüsü

10 saat sonra çene altı
Görüntüsü

Image document data

File C:\Users\SYNGENE\Desktop\erkek q dot 40. 6saat 10 saat.jpg
Created by Erciyes
User ID
Generated on 21 Mart 2018 Çarşamba 14:59:35
ID 1521631746
Template file



Black:0 White:255 Gamma:1.00

Properties

User Field 1
User Field 2
User Field 3
User Field 4
User Field 5

Capture GLP warning: This image was created from a non GLP source
Digitizer
Settings Source file: C:\Users\SYNGENE\Desktop\erkek q dot 40. 6saat 10 saat.jpg

Document history

Date: 21 Mart 2018 Çarşamba 15:01:42
Author: Erciyes

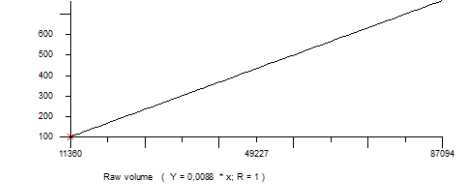
Spot	Raw vol.	ng	Background level
Spot 1	11360.00	100.00	0.00
Spot 2	87858.00	773.40	0.00
Spot 3	76883.00	667.98	0.00
Spot 4	27612.00	243.06	0.00

Quantity calibration details

Curve type Linear through origin (single standard value)
Units ng

User: Erciyes Created: 21 Mart 2018 Çarşamba 15:01:42 ID : 1335634380
Signature : Printed: 21 Mart 2018 Çarşamba 15:01:42 : Page 1

Calibrated quantity - ng

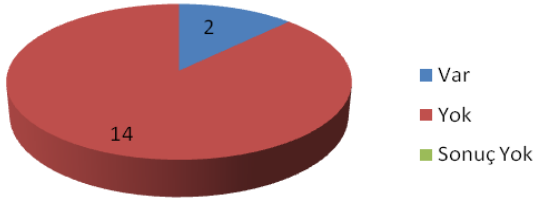


Spot	Raw vol.	Assigned quantity
1	11360.0	100.0

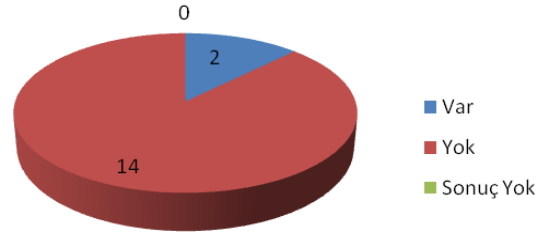
User: Erciyes Created: 21 Mart 2018 Çarşamba 15:01:42 ID : 1335634380
Signature : Printed: 21 Mart 2018 Çarşamba 15:01:42 : Page 2

Grafik 5. Erkek-Dişi Ratlarda Qdot 655'in 40 dk., 6 saat ve 10 saat sonra görüntü var, yok ve sonuç alınamayan görüntülere göre sayısal değerlerin dağılım grafiği aşağıdaki gibidir.

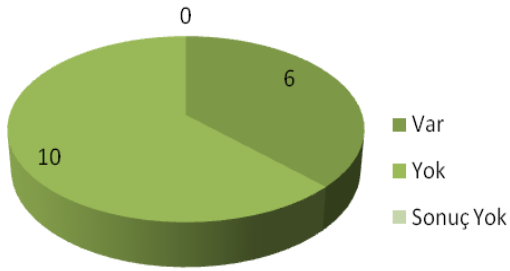
Qdot 655 Erkek Rat. 40 dk. sonra Görüntü



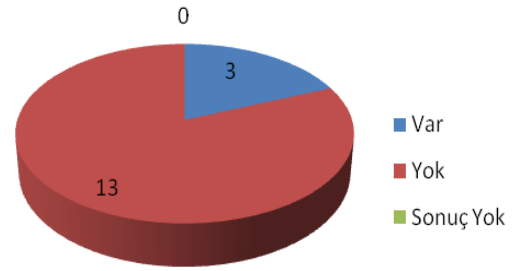
Qdot 655 Dişi Rat. 40 dk. Sonra Görüntü



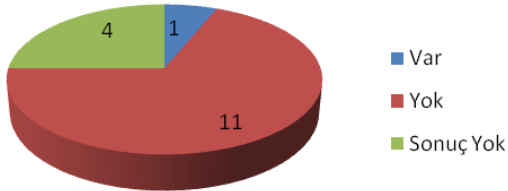
Qdot 655 Erkek Rat. 6 saat sonra Görüntü



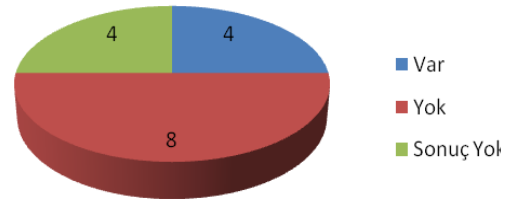
Qdot 655 Dişi Rat. 6 saat Sonra Görüntü



Qdot 655 Erkek Rat. 10saat sonra Görüntü



Qdot 655 Dişi Rat. 10 saat Sonra Görüntü

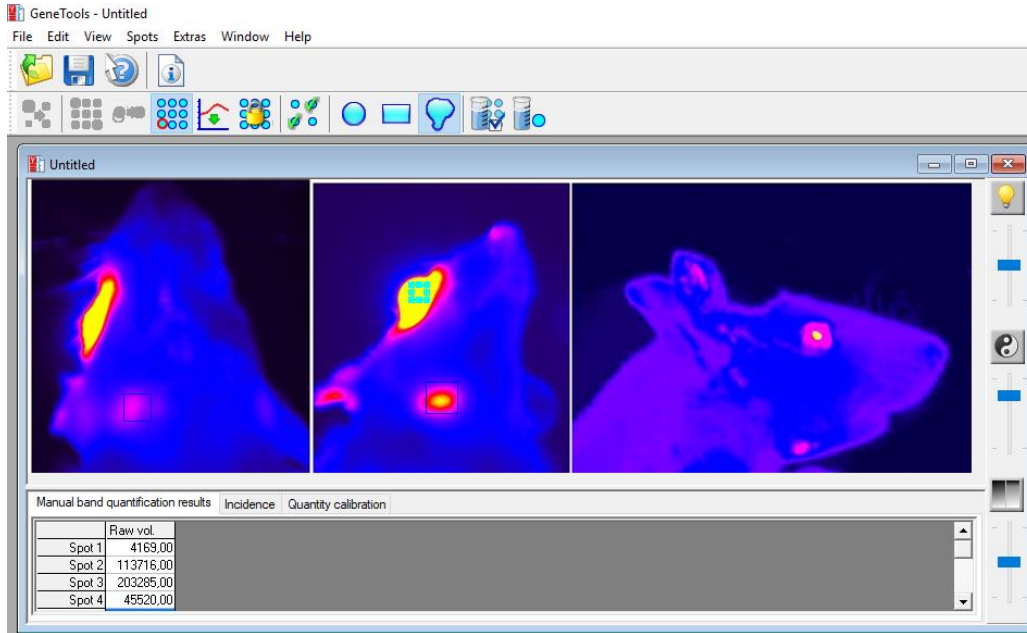


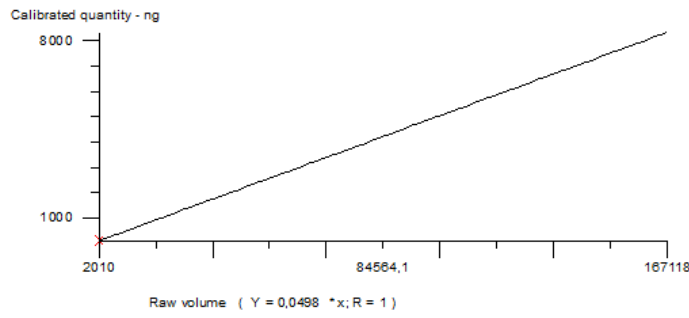
3.1.3 İnvivo imaging görüntülerin hesaplanması.

Dişi ve Erkek Rat.larda 40 dk., 6 saat ve 10 saat sonra görüntü var, yok ve sonuç alınamayan görüntülere göre miktar hesaplamaları yapıldı. Hesaplamalar için şu yollar izlendi;

Floresan veren görüntülerin etrafı işaretlenerek hesaplama alanının belirlenmesi Referans olarak ışıma yapılan bölge işaretlendi ve bilinen değer girildi. Diğer ışımlar bu bölgeyi referans alarak miktar hesaplamaları otomatik olarak yapıldı. .Miktar hesaplamasına göre bir çizelge, Raw hacim hesaplanması sistem tarafından gerçekleştirildi ve en son sistem raporu alındı.

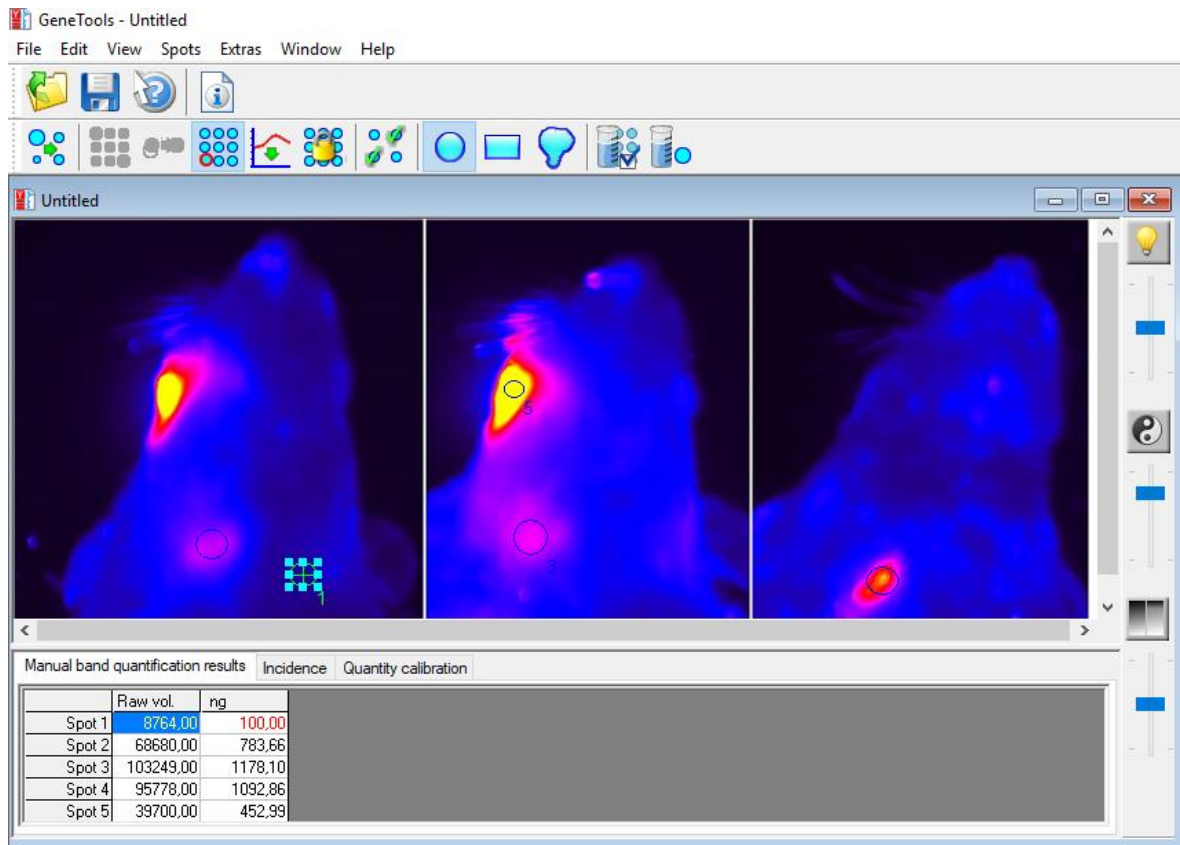
3.1.3.1 Erkek ratlarda görüntü alanlarının işaretlenmesi

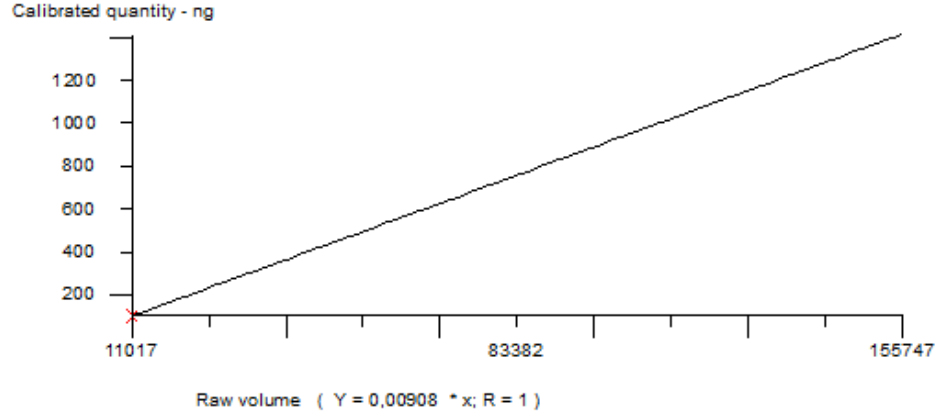




Spot	Raw vol.	Assigned quantity
1	2010,0	100,0

3.1.3.2. Dişi ratlarda görüntü alanların işaretlenmesi



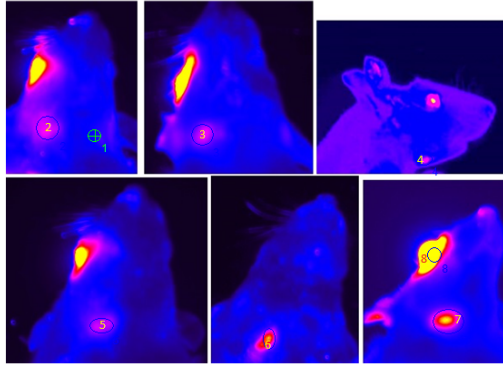


Spot	Raw vol.	Assigned quantity
1	11017,0	100,0

3.1.3.1.3 Erkek ve Dişilerin ICG raporlarının birlikte alınması

Image document data

File C:\Users\SYNGENE\Desktop\dşgi ve erkekler icg 40.6..10.jpg
 Created by Erciyes
 User ID
 Generated on 21 Mart 2018 Çarşamba 12:45:33
 ID 1521623704
 Template file



Black:0 White:255 Gamma:1,00

Properties

User Field 1
 User Field 2
 User Field 3
 User Field 4
 User Field 5

Capture
 Digitizer GLP warning: This image was created from a non GLP source
 Settings Source file: C:\Users\SYNGENE\Desktop\dşgi ve erkekler icg 40.6..10.jpg

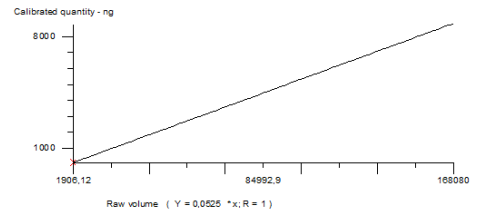
Document history

Date: 21 Mart 2018 Çarşamba 12:47:58
 Author: Erciyes

Spot	Raw vol.	Background level	ng
Spot 1	1906,12	6,58	100,00
Spot 2	77813,41	72,83	4071,00
Spot 3	66852,45	41,54	3496,76
Spot 4	15021,39	18,24	788,06
Spot 5	44462,43	52,36	2332,62
Spot 6	63334,57	35,57	3322,70
Spot 7	189757,20	11,89	8905,91
Spot 8	5596,46	231,44	293,60

Quantity calibration details

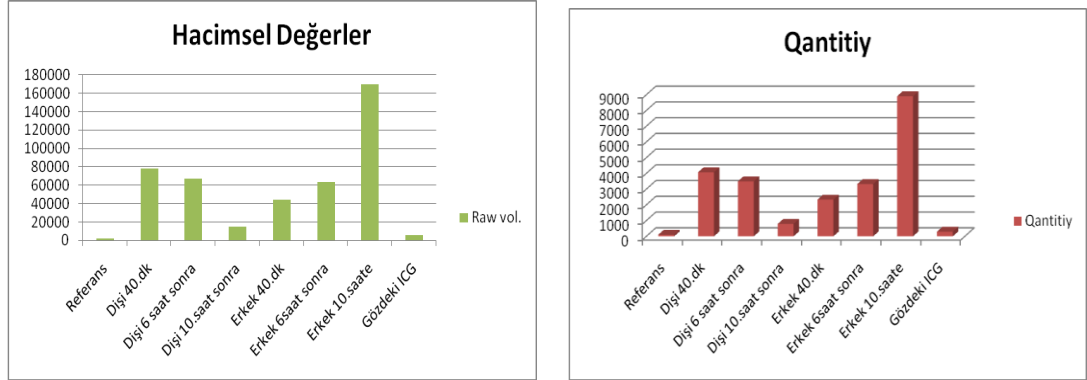
Curve type Linear through origin (single standard value)
 Units ng



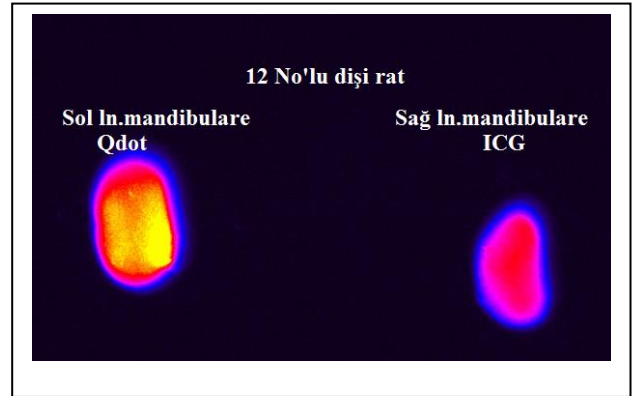
Spot	Raw vol.	Assigned quantity
1	1906,1	100,0

User: Erciyes Created: 21 Mart 2018 Çarşamba 12:47:58 ID: 813574603
 Signature: Printed: 21 Mart 2018 Çarşamba 12:47:58 : Page 2

Grafik 6. Her iki türe ait Sistem raporuna göre miktar tayinin hacimsel ve quantitatif değerleri dağılımlarının grafiksel yorumu



3.1.3.4 12 nolu diş rat'ın sağ ve sol ln. mandibulares'lerinin SYNGENE MARKA G:BOX CHEMI XRQ [Hi-LED Sistemi] deki görüntüsü



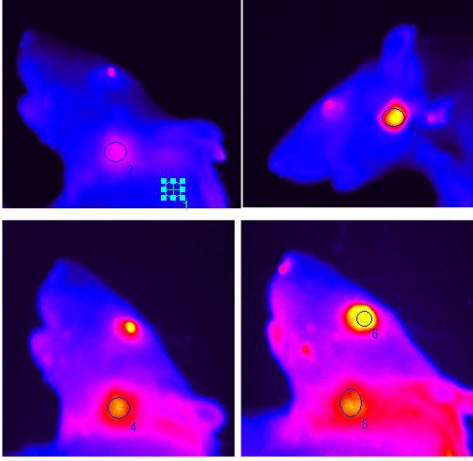
3.1.3.5 Qdot655'in parotis lenf yumrusundaki görüntüsü

5 nolu dişi bir ratta 40. dk ve 6 saat sonra parotis bölgesinde alınan floresans görüntüsü.

SynGene_GeneTools - File version: 4.3.8.0 - Serial No. 9999*9999*license*mpcsdb23g
SynGene Laboratories
denemeler1

Image document data

File: C:\Users\SYNGENE\Desktop\parotis ile ilgili erkek ve dişi ratlar.jpg
Created by: Erçiyas
User ID:
Generated on: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:31:27
ID: 1521631006
Template file:



Black:0 White:255 Gamma:1.00

Properties

User Field 1
User Field 2
User Field 3
User Field 4
User Field 5

User: Erçiyas Created: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:34:14 ID: 995502539
Signature: Printed: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:34:14 : Page 1

SynGene_GeneTools - File version: 4.3.8.0 - Serial No. 9999*9999*license*mpcsdb23g
SynGene Laboratories
denemeler1

Capture: GLP warning: This image was created from a non GLP source
Digitizer: Source file: C:\Users\SYNGENE\Desktop\parotis ile ilgili erkek ve dişi ratlar.jp
Settings:

Document history

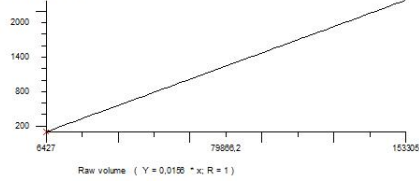
Date: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:34:14
Author: Erçiyas

Spot	Raw vol.	ng
Spot 1	6427.00	100.00
Spot 2	87652.00	1363.81
Spot 3	96957.00	1508.59
Spot 4	112858.00	1756.00
Spot 5	154788.00	2408.40
Spot 6	52838.00	822.13

Quantity calibration details

Curve type: Linear through origin (single standard value)
Units: ng

Calibrated quantity - ng



Spot	Raw vol.	Assigned quantity
1	6427.0	100.0

User: Erçiyas Created: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:34:14 ID: 995502539
Signature: Printed: 21 Mart 2018 Çarşamba 13:34:14 : Page 2

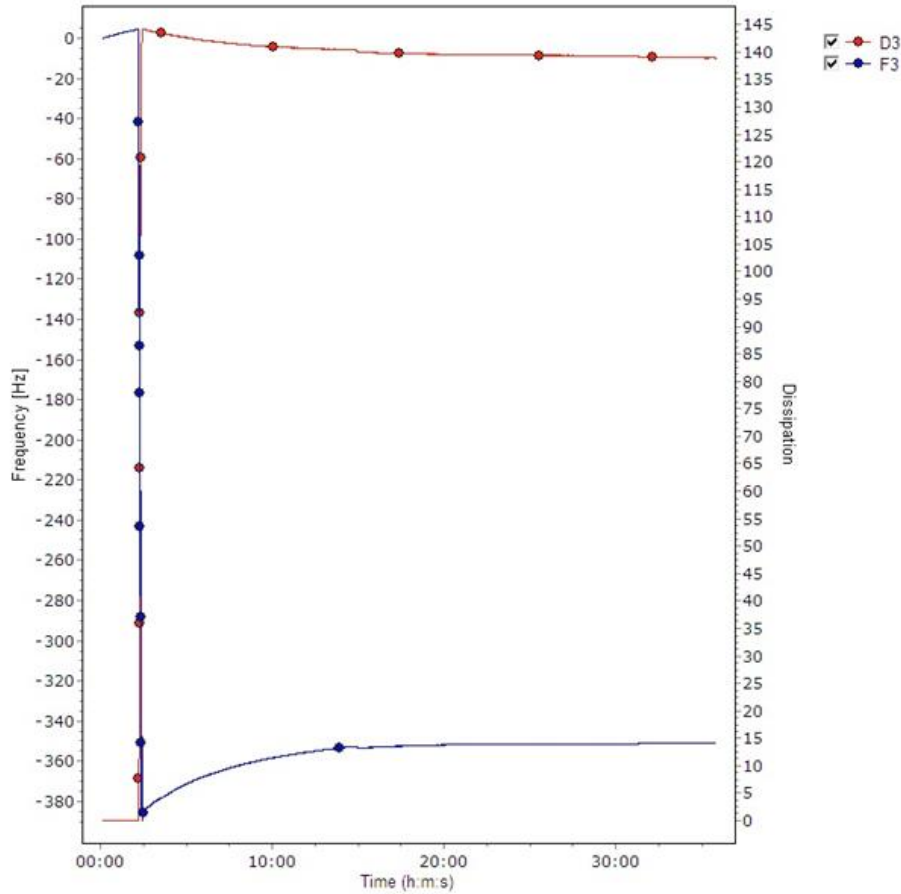
3.2 QCM İLE QDOT 655 İLE HUMOR AQUOSUS [HA] ARASINDAKİ FİZİKSEL YADA KİMYASAL ETKİLEŞİM

Bu amaçla kullanılan bir erkek ve bir dişi Wistar albino rat , Daha önce ERNAM [ERÜ. Nanoteknoloji Araştırma Merkezi] da Hamilton 2.5µl lik enjektörle çekilen 1.00 µl qdot655, 100µl, 8nm borat tamponu içinde konuldu. Elde edilen karışım atılın kaplamalı quartz sensör üzerinde santrifüj kullanılarak kurutuldu.

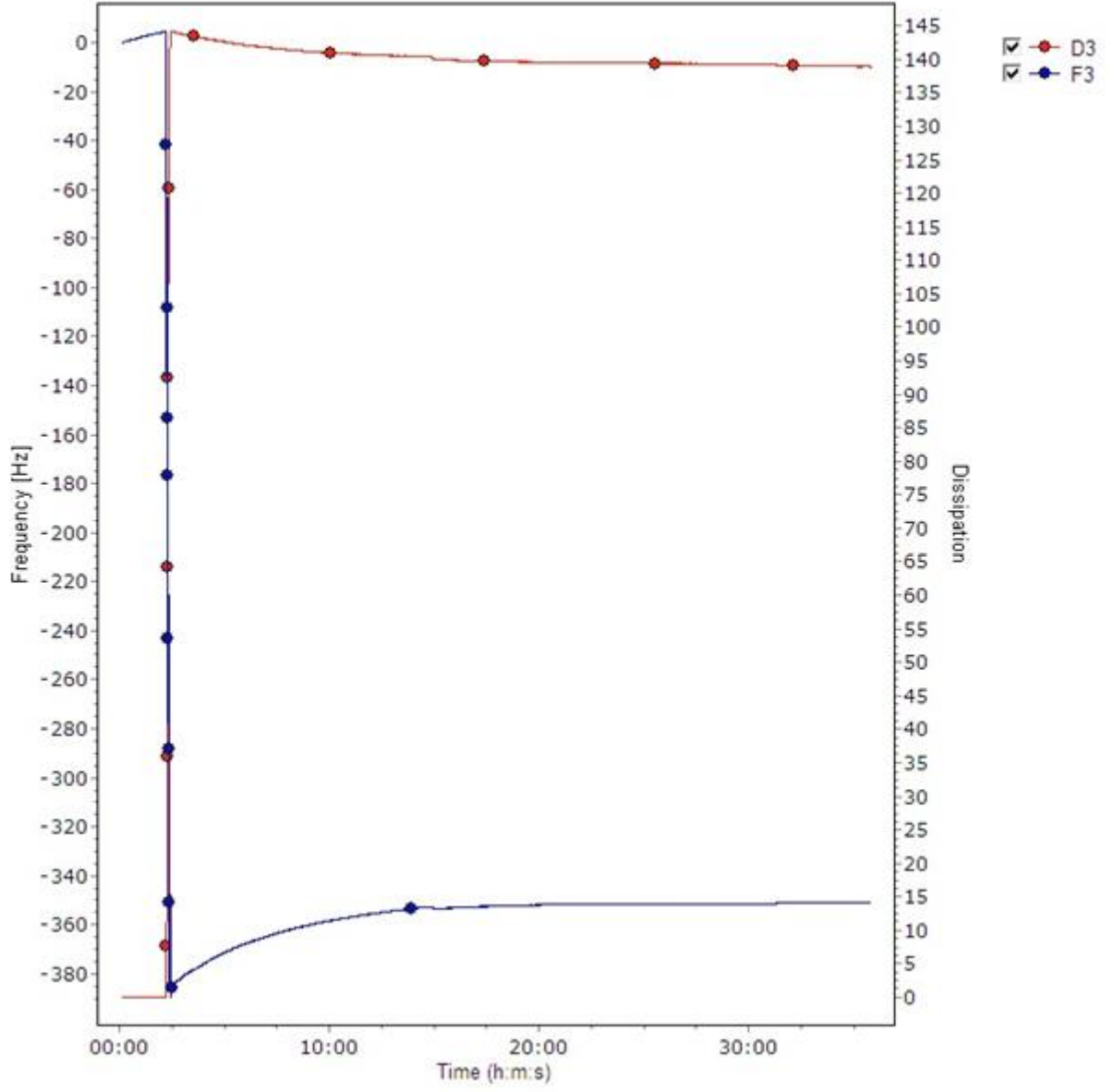
Daha sonra genel anestezi altındaki bir adet erkek ve bir adet dişinin sol gözlerinden alınan 1.5 µl humor aquous, 200 µl ultra distile suyla karıştırıldı. Elde edilen karışım, QCM-D cihazında 5 MHz frekansında Qdot üzerinden geçirilerek aralarında nanogram boyutunda herhangi kimyasal bir etkileşim olup olmadığına bakıldı.

Elde edilen sonuçlar grafiksel olarak değerlendirildiğinde her iki türde de HA' ile qdot655 arasında herhangi bir etkileşim içinde olmadığı görüldü.

Grafik 7. Dişi Rat Qdot655 ile HA arasındaki etkileşim grafiği



Grafik 8. Erkek Rat Qdot655 ile HA arasındaki etkileşim grafiği



3.3 RADİOGRAFİK BULGULAR.

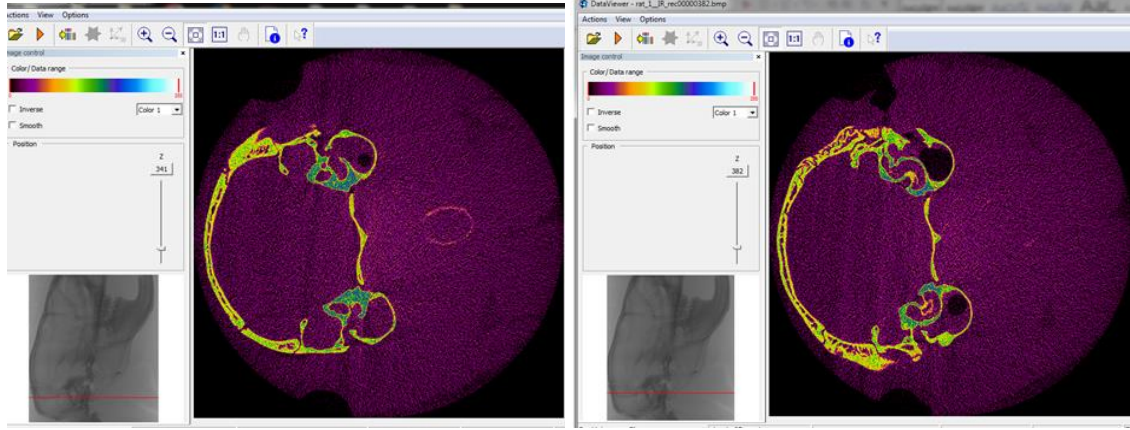
Aşağıdaki radio grafik çekimlerinde de görüleceği üzere gerek Qdot'ın gerekse ICG nin görüntü vermediği ortaya çıkmıştır.



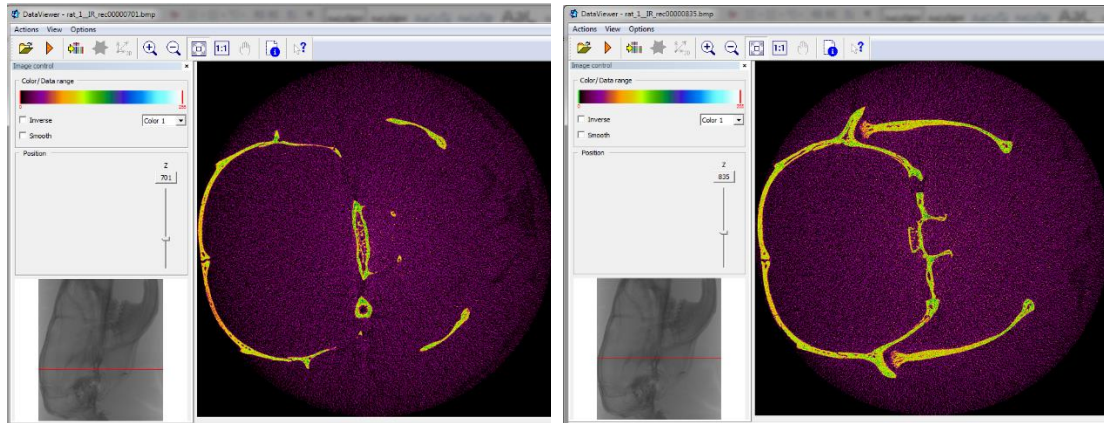
3.4 Micro CT tarama sonuçları

Gerek Qdot655 gerekse ICG nin Micro –CT (skyscan 1172) taramasında elde edilen sonuçlar

3.4.1 Orta kulak seviyesi ve ramus mandubula seviyelerinde paramanyetik bir görüntü elde edilemedi.



Şekil Orta kulak seviyesi. Caudal'den cranial'e doğru

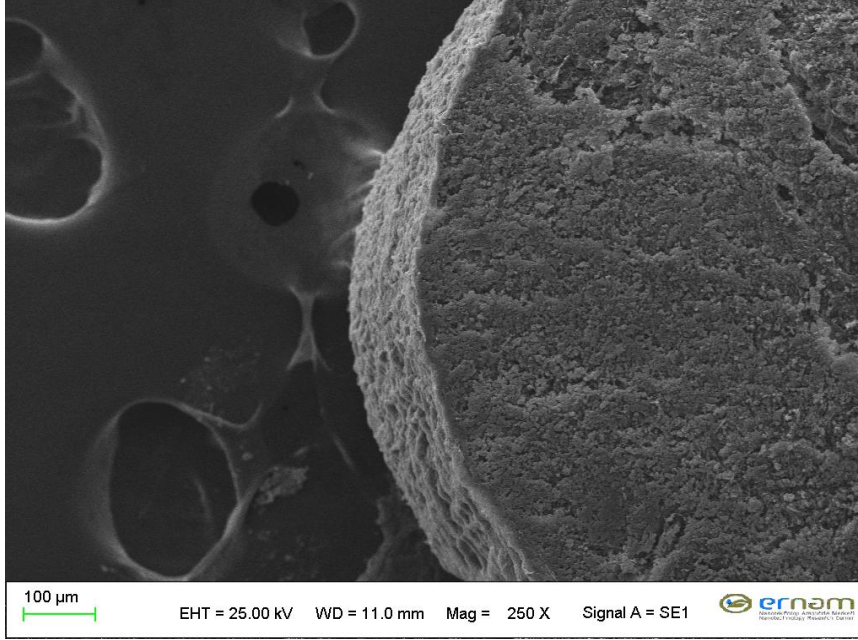


Şekil Orta kulak kaybolma seviyesi, alt çeneler oldukça belirdin Göz bölgesinde paramanyetik görüntü yok.

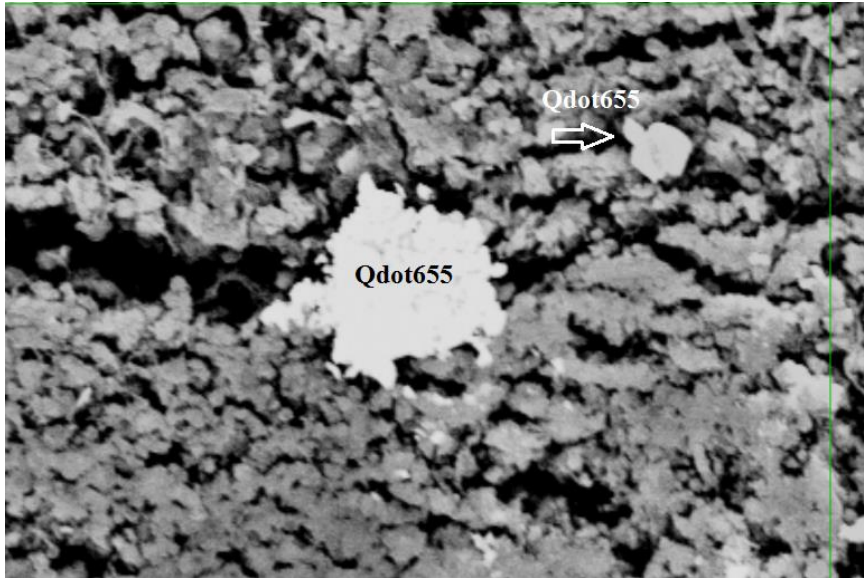
3.5 SEM GÖRÜNTÜLERİ

3.5.1 Lenf yumrusundaki SEM görüntüler

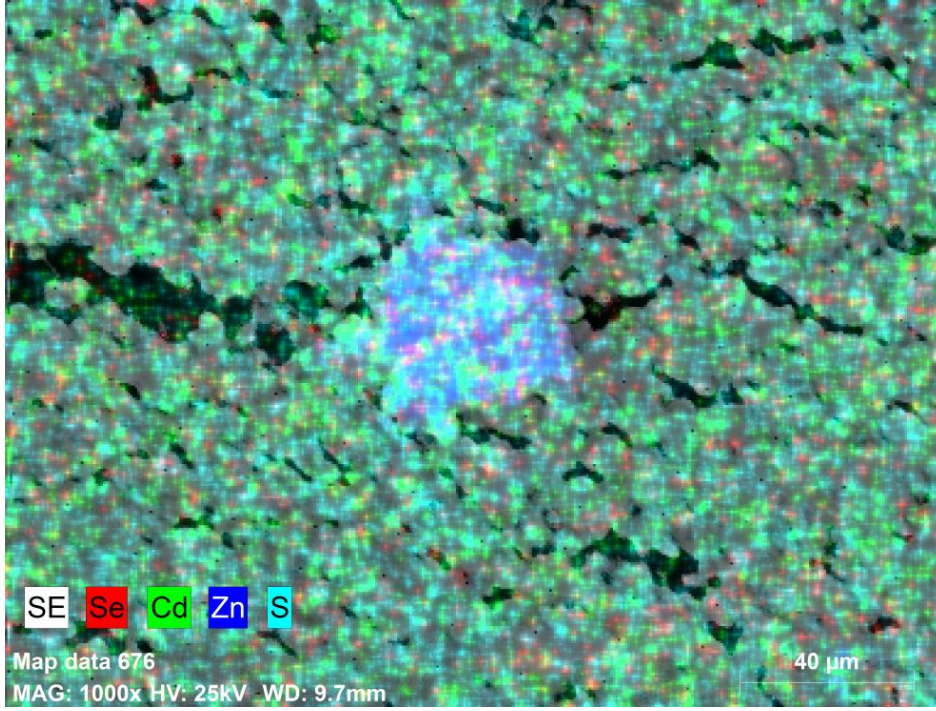
3.5.1.1. 14 nolu erkek rat'ın sol ln.mandibularis'ideki normal SEM görüntüleri



3.5.1.2 14 nolu erkek rat'ın sol ln.mandibularis'ideki normal SEM ile EDX taraması

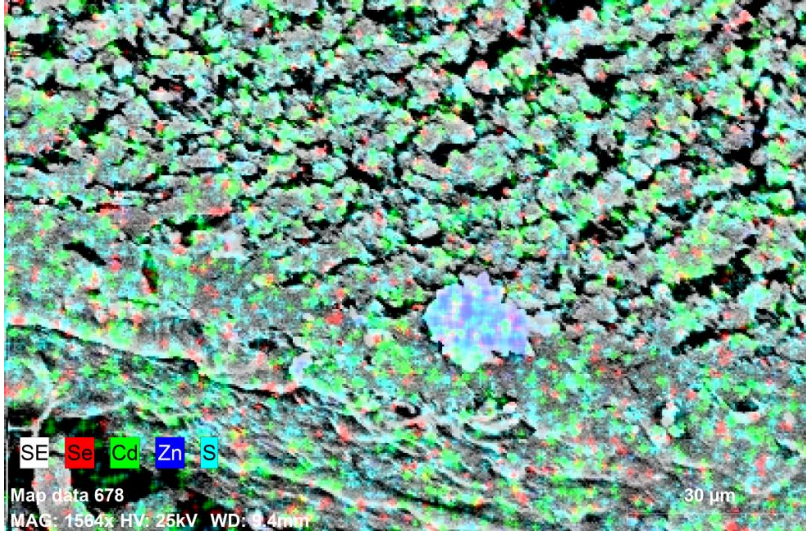


3.5.1.3 14 nolu erkek rat'ın sol ln.mandibularis'ideki normal SEM ile EDX ile mappingi



Map data 678
Date:3/2/2018 10:05:56 AM
Image size:414 x 270
Mag:1563.73926x
HV:25.0kV

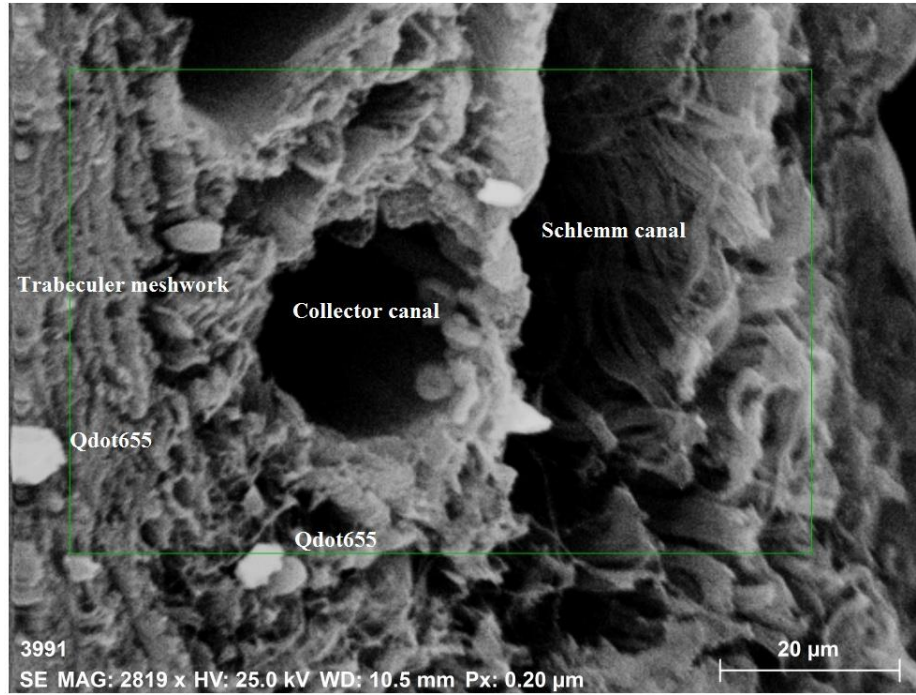
3.5.2.2 15 nolu dişi ratın sol lenf yumrusunun normal SEM görüntüsü ve EDX ile çıkarılan mappingi



Map data 678 Date:3/2/2018 10:05:56 AM Image size:414 x 270 Mag:1563.73926x HV:25.0kV

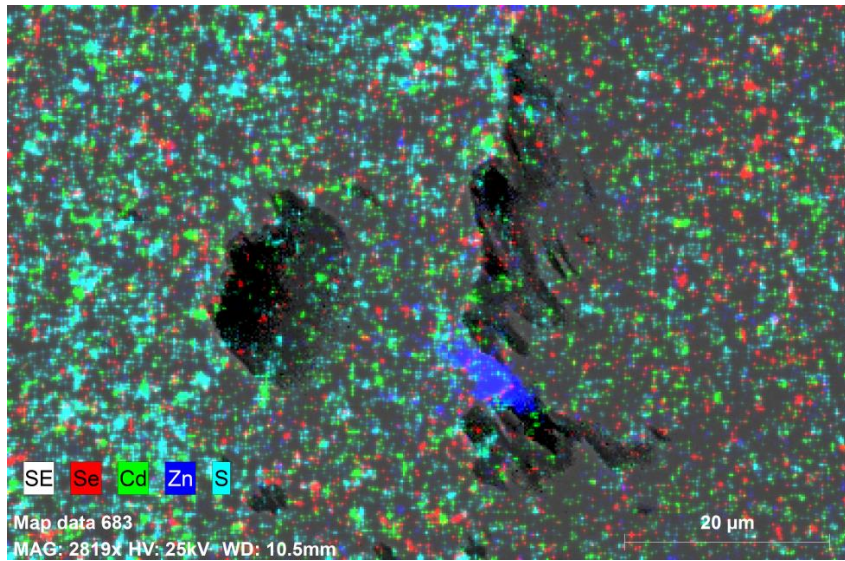
3.5.3 SCHLEMM KANALI İLE İLGİLİ SEM GÖRÜNTÜLERİ

3.5.3.1 4 nolu erkek rat 6 saat sonra normal SEM görüntüsü



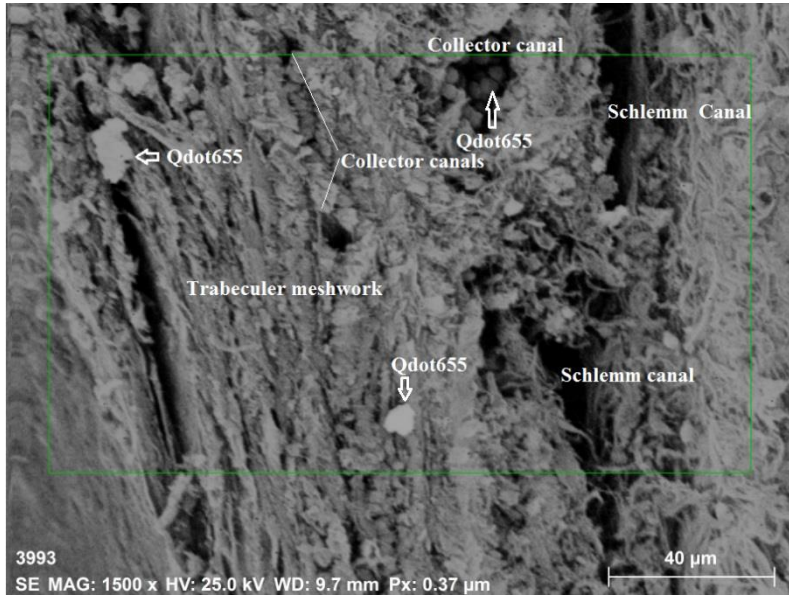
Date:3/2/2018 10:28:14 AM
Image size:512 x 384
Mag:2818.64209x
HV:25.0kV

3.5.3.1.1 4 nolu erkek rat 6 saat sonra EDX görüntüsü



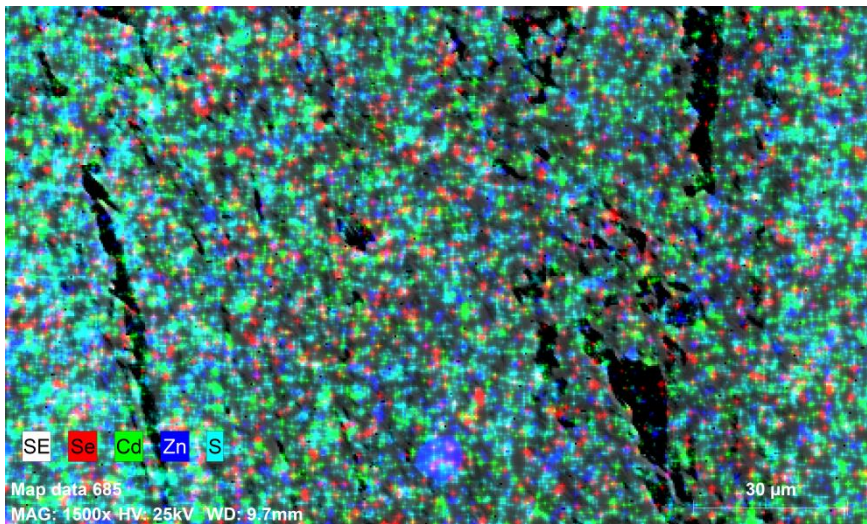
Map data 683
Date:3/2/2018 10:28:20 AM
Image size:414 x 270
Mag:2818.64209x

3.5.3.2 14 nolu erkek rat 10 saat sonra SEM görüntüsü



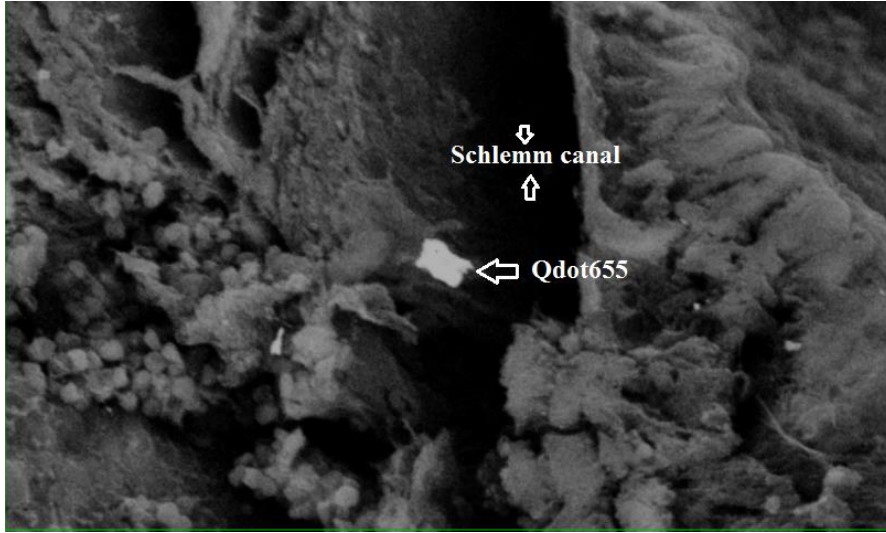
3993
Date:3/2/2018 10:36:27 AM
Image size:512 x 384
Mag:1500x
HV:25.0kV

3.5.3.2.1 14 nolu erkek rat 10 saat sonra SEM görüntüsü



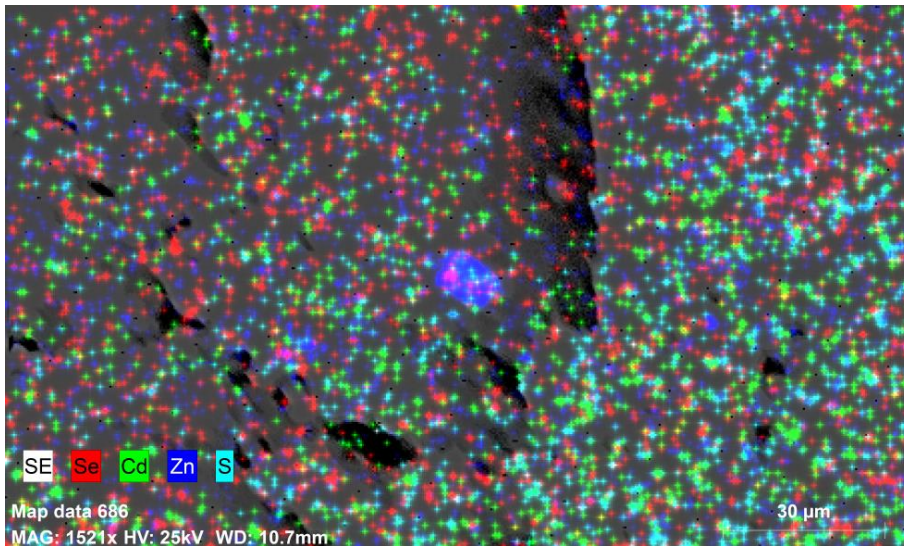
Map data 685
Date:3/2/2018 10:36:39 AM
Image size:454 x 271
Mag:1500x
HV:25.0kV

3.5.3.3 9 nolu dişi rat 6 saat sonra SEM görüntüsü



Date:3/2/2018 10:42:13 AM
 Image size:512 x 384
 Mag:1520.97559x
 HV:25.0kV

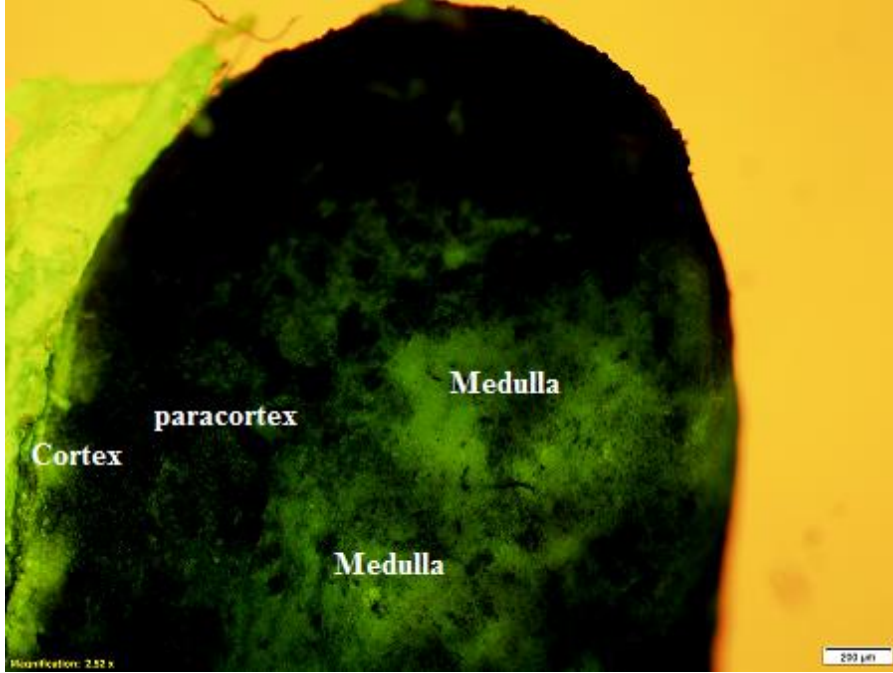
3.5.3.3.1 9 nolu dişi rat 6 saat sonra EDX ile mappingi



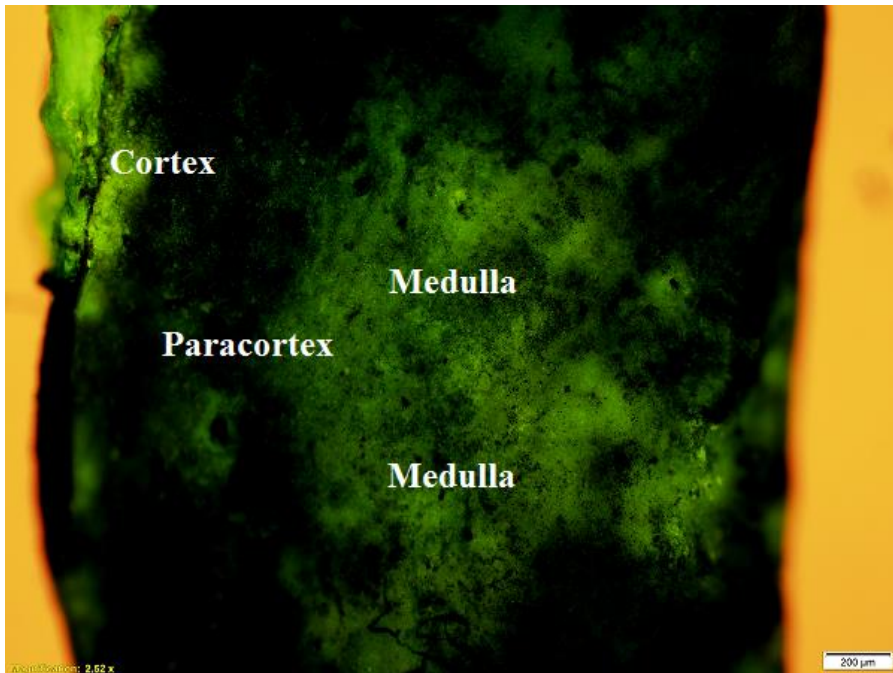
Map data 686
 Date:3/2/2018 10:42:23 AM
 Image size:454 x 271
 Mag:1520.97559x
 HV:25.0kV

3.6. QDOT655'in FLORESAN IŞIK MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ

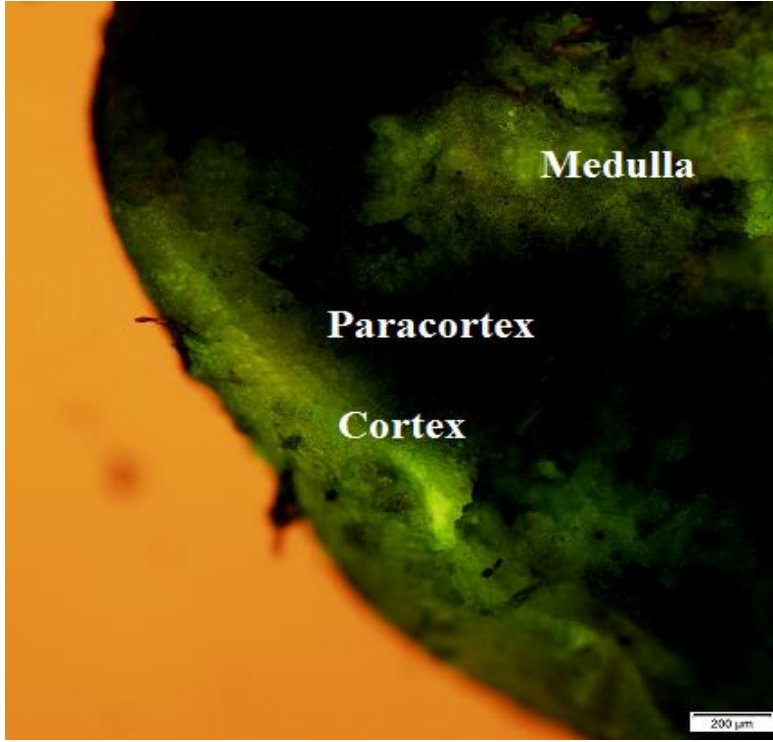
3.6.1 Dişi sol Lenf yumrusunun cortex ve medulla kısmında görülen floresans görüntü [Qdot 655]



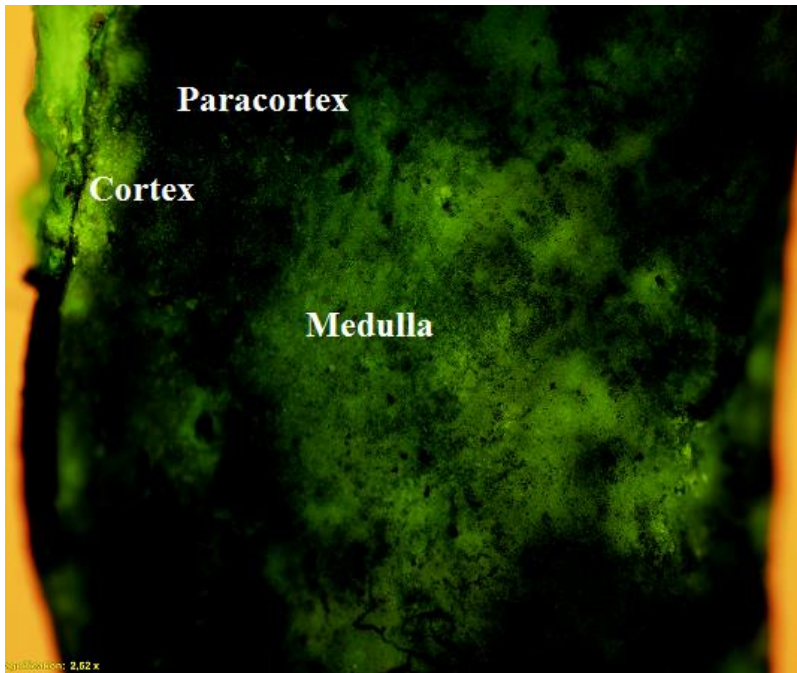
3.6.2 Dişi sol Lenf yumrusunun cortex ve medulla kısmında görülen floresans görüntü [Qdot 655]



3.6.3 Erkek sol Lenf yumrusunun cortex ve medulla kısmında görülen floresans görüntü [Qdot 655]



3.6.4 Erkek sol Lenf yumrusunun cortex ve medulla kısmında görülen floresans görüntü [Qdot 655]



4. BÖLÜM

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada ülkemizde hem laboratuvar ortamında deney hayvanları üzerinde ilk kez in-vivo imaging çalışması yürütülmüş hemde Nanotracer olarak Qdot655 ile ICG gibi floresan veren maddeler karşılaştırmalı olarak hiperspektral floresan görüntüleme kullanılarak çalışılmıştır.

Genelde daha küçük, hiperspektral floresan görüntü alma imkanı daha kolay fareler kullanılmıştır. Bu çalışmada 9 haftalık Wistar albino rat kullanılmıştır. İlk kez Scan elektron mikroskopta nanopartiküllerin EDX ile görüntüleri hem Schlemm kanalında hemde mandibular lenf yumrusunda varlıkları tespit edilmiştir. Bu bakımdan ilktir. Ayrıca Qdot 655'in mandibular lenf yumrusunda hem cortex hemde medullar kısmında varlığı tespit edilmesi de bir başka ilktir. Oysa Alex L. ve ark'nın [61] yürüttüğü çalışmada sup kapsullar bölgede immun floresan boyama ile varlığını ortaya koymuşlardır.

Gözde gerek corrosion cast gerekse [64,65,66] gerekse gözün drenaj sistemleri üzerine yapılan çalışmalarda [Gruntzig ve arkadaşları, 1977, 1978a, 1978b, 1979] genel görüş olarak gözde lenf damarları bulunmamaktadır. Oysa son yıllarda yapılan çalışmalarda [61,62,63] artık bu görüşte yıkılmıştır.

QD'lerin hidrodinamik özelliği ve floresan yayması, lenfatik damarlara ve lenf bezlerinde nüfuz edebilmesi, in-vivo görüntüleme yönteminde kullanılabilmesi bu maddeye karşı ilgiyi arttırmıştır. Bununla birlikte hiperspektral görüntüleme sisteminin optik çözünürlüğü, TM, UVS drenajı ve iriste QD'lerin in vivo görselleştirilmesini kısıtlamıştır. Koronal orbital kesitlerde UVS yolunda QD'lerin lokalizasyonu gösterilmiş olmakla birlikte, konvansiyonel drenajda yer alan TM ve schlemm kanalında QD'ler değerlendirilemediği [yücel latanoprost] ortaya konulmuş olmasına rağmen yürüttüğümüz çalışmada Schlemm

kanalında trabekül meshwork'de QD'ların varlığı ortaya konulması bakımından önemli ve bir ilktir.

İnsan ve diğer memelilerin corpus ciliaris'lerinde lenf damarlarının varlığı bilinmektedir. Bu amaçla humor aqueous [HA]'a enjekte edilen radyo aktif maddelerin protein markerlarla cervical lenfatiklere ulaştığı dikkati çekmiştir. HA'un drenajında convansiyonel olan uveoscleral [iris, corpus ciliare, choroid] yol'un drenajındaki payı koyunlarda 3 saat içinde 69:22 olarak tespit edilmiştir [71]. Bu oran, Cynomolgus maymunlarında 45:55 [26-Bill, 1971], farelerde 72:25 [Aihara ve ark., 2003] ve köpeklerde ise 85:15 [Barrie ve ark., 1985], tavşanlarda ve kedilerde 92-97: 3-8 ve 97: 3'tür [20,74] kadardır.

Yürüttüğümüz çalışmada kullanılan nanopartikül ve ICG nin mandibular lenf yumrusunda tespiti HA'un uveolenfatik bir yol izlediğinin kesin kanıtıdır. Ancak gözdeki lenfatik sistemin anatomisi ve fizyolojik yapısının karmaşık olması, anestezi altındaki hayvanın hareketsizliği, genel anestezi [Quinn ve Shannon, 1975], hareketsizlik ve mekanik ventilasyon [Negrini ve Moriondo, 2011] gibi deneysel koşullar, lenf akışında azalmaya yol açacaktır. Bu nedenle invivo imaging görüntülerin alınmasında birkaç 6.saatte çok hafif görüntü alabildiğimiz yada görüntü alamadığımız ratlardan bazılarında 10.saatte görüntü alabilmemizin sebebi fizyolojik farklılıkların yanı sıra HA'un ilerleme hızı ve deri, bağ doku kalınlıklarının görüntü almayı zorlaştıran faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle Tablo.1 e bakıldığında dişilerde görüntü oranı erkeklerden daha yüksektir. Fare derisinin ve kürkünün QD saptama hassasiyetini azalttığı bilinmektedir [77,78]. Bu, post-mortem görüntülemeye cildin çıkarılmasından sonra gözlemlendiğimiz daha güçlü QD sinyal alınmasının nedeni budur. Bu nedenle, bazı QD'lerin, izleyici enjeksiyonunu takiben ilk tespit süresinden daha erken boşaltılma olasılığını dışlayamıyoruz. QD655 duyarlılığındaki bu azalma in-vivo hiperspektral görüntülemenin niceliksel analizi için uygun olmayabilir [79].

Ratlarda deneysel olarak oluşturulabilecek glukom modelleri ile terapötiklerin geliştirilmesi ve test edilmesinde önemli modeller [80-81] olabilecektir.

Bilindiği üzere glokom tedavisinde prostanoidler kullanılır ve uveoskleral yoldan drenajı arttırdığı bilinmektedir. Prostaglandin F2 alfa ve onun analogları olan insanlarda [Torriss ve ark., 1993] ve maymunlarda [Nilsson ve ark., 1989], prostaglandin D2'de Tavşanlarda [Goh ve ark. 1989] ve prostaglandin A2'de kedilerde [Torriss ve ark. 1995] uveoskleral drenaj arttırdığını tespit etmişlerdir. Dolayısıyla, PGF2 α tedavisi, uveoskleral göz

dokusuna [siliyer kas] drenajı artıracak ve sonuç olarak HA'un lenfatik drenajını arttıracak tahmin edilecektir. Lenfatik damarlar, lenfatik drenajı arttıran prostaglandin analoglarını içeren çok çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik ajanlara [Johnston, 1985] yanıt verir [Amann-Vesti ve ark., 2003].

Koyunlarda, Trabekuler meshwork, Uveoscleral ve lenfatik drenajın ayrıntılı kantitatif değerlendirme çalışmaları yanı sıra geliştirilmiş glokom koyun modeli [Gerometta ve ark., 2009] yeni IOB'ı düşürücü ilaçların geliştirilmesinde ve test edilmesinde yararlı olduğu için özellikle önemlidir [Gerometta ve ark., 2010a].

Bu rapordaki veriler ve literatürden elde edilen veriler ışığında gözün anterior odasına enjekte edilen gerek Qdot66 gerekse ICG lenfatik sisteme girdiği, mandibular lenf yumrusuna ulaştığı. Gerek veriler gerekse literatür karşılaştırmaları açısından üzerinde çalışılan deney hayvanlarının invivo imaging görüntüleri yanısıra gerek elektron mikroskopik görüntülerindeki gerekse floresan ışık mikroskopundaki verileri Uveo-lymphatic bir geçişin olduğunu kesin bir şekilde göstermektedir. Bu çalışma, gözün lenfatik çıkışındaki ilaç etkilerinin daha fazla araştırılmasını teşvik edeceği gibi glokomda görme kaybını önlemek için yeni göz içi basınç düşürme tedavilerine yol açabilecektir.

Elde edilen sonuçlara göre, insan gözündeki lenfatik drenaj ile koyunlar için bildirilen lenfatik drenaj ile uyumludur[89]. Submandibuler lenf nodunda, intracameral enjeksiyonun ardından güçlü QD sinyali gözlemlendiğinden, gözden akan HA'un lenf nodu gibi görünmektedir. Kullandığımız görüntüleme sisteminde görüntü alamadığımız durumlarda bile diseke edilmiş lenf yumrularında QD'lerin varlığı göz ardı edilemez şekilde tespit edilmiştir. Çalışmamız aynı zamanda, QD'lerin ocular lenf drenajının varlığını göstermesi bakımında yararları tartışılmazdır.

Alex ve ark. [61] 'nın ortaya koyduğu gibi camera oculi anterior'a verdilen gerek Qdot gerekse ICG'nin invivo imaging görüntüleri aldığımız 6. saat ve 10. saatteki görüntülerinde boyun bölgesinde herhangi bir floresan görüntü alınmadığı tespit edilmiştir. QD'lerin submandibular lenf noduna doğru drene olduğunu, ancak servikal veya fasiyal lenf nodlarını görmediğini gözlemledik. İntra ocular Qdot enjeksiyonun bir erkek ve bir dişi ratta parotid lenf yumrusuna drene olduğu tespit edilmesi de bir ilk olarak da önemlidir. Bu konuda ayrı bir çalışma yapılması gerektiği düşünülmelidir. Yaptığımız bu araştırmada, intrakameral enjeksiyonun ardından 6 saatte QD'in doku aralıklarında kalmasının nedeni kullanılan 1,25 µL Qdot655 enjeksiyon hacmi olabilir.

Koyun siliyer cisimciğindeki lenfatiklerin varlığı, HA'un drenajı için ideal bir yol sağlar [63]. Koyunlarda, ön kamaraya enjekte edilen tracerlerin, siliyer cisimdeki lenfatik yoluyla baş ve boyun lenf düğümlerine boşaltılır. Bazı çalışmalarda görüleceği üzere intraoküler antijenlerin lokal lenf nodlarına drenaj olabileceğini ortaya koymuştur [63]. fare gözüne enjekte edilen tracerlerin kısmen siliyer cisimdeki lenfatiklere bağlı olması nedeniyle submandibuler lenf noduna [61] gittiği iddia edilebilir.

Farelerde ekstraoküler kaslarda ve ekstraoküler kas konilerinin bağ dokularında lenfatikler araştırıldı ancak lenfatik damarlara rastlanılmadı [90]. Bununla birlikte, lenfatik bir endotelyal hücre markeri olarak podoplanin kullanarak, farelerde Harderian bezi yakınlarında lenfatik kanalların varlığını tespit edilmiştir [61]. Etraftaki lenfatik kanalların varlığı, oküler / orbital doku sıvısının drenajını yolu sağlayabilir. HA'un UVS yolu üzerinden süzölmüş olduğundan, orbital lenfatik damarların skleral portalların çıkış bölgelerinden gelen sıvıyı boşaltması da mümkündür. Orbital lenfatikler yoluyla drene edilen lenf kökeni ve giderinin belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Fare [61] 'de oküler lenfatik drenajın varlığı, bu drenaj yolunun farmakolojisini incelemek için fırsatlar doğurmuştur. Burada, yaygın olarak reçete edilen bir glokom ilacı olan topikal bir PG latanoprost' un, lenfatik drenajı göze karşı uyardığı ortaya konulmuştur. Latanoprost kullanıldığında hücrelerde bir takım etkileşimler söz konusu olabilir. Şöyleki: Siliyer kaslarda gevşeme [91] ve Prostaglandin F [FP] reseptörleri üzerinde [91,92] etki ederek oküler lenfatik drenajın artmasına katkıda bulunabilir. PG'ler, lenfatik peristaltik hareketlerden sorumlu lenfatik kanalları çevreleyen lenfatik endotelyal ve kontraktil hücreler üzerinde etki gösterirler [93]. Latanoprost, matriks metalloproteazlarını [MMP], proMMP-1 ve proMMP-3'ü [94] etkisini arttırırken, kolajenleri, fibronektini, laminin ve hyaluronayı azaltarak hücre dışı matriksi yeniden şekillendirir [95,96]. Buna rağmen uzun dönem latanoprost tedavisi görenlerde bu hücresel değişikliklerin, lenfatik drenaj ile ilişkili olup olmadığı net bilinmemektedir [61].

HA'un dinamiklerine, çeşitli türlerde [97,98] çalışılmıştır. Latanoprost uygulamasını takiben lenfatik drenaj oranının artması, IOB'da azalmaya neden olması, normal farelerde latanoprostun IOB azaltan etkisi, insanlara benzediğinden [72], fare gözünden lenfatik drenajın varlığı, IOB'yi azaltmak için çeşitli farmasötik ilaçların ve glokom tedavilerinin geliştirilmesi için bir çalışma alan sağlar. Ayrıca glokom fare modellerinde [99] yapılan

ileri incelemeler, latanoprost kullanılarak göze lenfatik drenajın uyarılması dolayısıyla IOB'in düşürülmesinde oynadığı rol bakımından da önemli olacaktır.

HA'un drenajında oküler lenfatikler, HA'un drenajında önemli bir rol oynadıklarından glokom çalışmaları için oldukça önemlidir. Koyunda, Camera oculi anterior'a enjekte edilen Qdot 'ın hem Trabeculer meshwork'deki collector kanalların etrafında hemde Schlemm kanlı etrafında tespit edilmesi, ardından aynı tespitin mandibular lenf yumrusunda gözlenmesi, HA'un drenajında lenfatik kanalların olduğunun tespiti bakımından önemlidir.

Koyunda, intrakameral olarak enjekte edilen izleyicinin, siliyer kanaldaki lenfatik kanalların lümeninde yer aldığının tespiti HA'un drenajında lenfatik kanalların rol oynadığını göstermiştir [62].

QD'lerin çevre dokularda lokalizasyonu, HA'un drenajında yer alan orbital lenfatiklerin olasılığını arttırmaktadır. Tracer'lerin orbital lenfatikler tarafından nereden drene edildiği yer şu anda bilinmemektedir.

QD'lerin gözün ön kamerasından submandibuler lenf noduna aktığı genel yolları anlamak çok önemlidir. Çünkü bu izleyicilerin Lenfatik drenajın siliyer kasın hücre dışı boşluklarında başlaması ve suprakoroidal alan ve anterior koroid içine girmesi olasıdır. Daha sonra ağ, sklera yada penetran damarları ve sinirleri çevreleyen gevşek bağ dokusu aracılığı ile submandibuler lenf noduna doğru dokulara doğru ilerlemiş olabilir.

Oküler lenfatik drenaj bulguları, oküler immün yanıtları ve metastazları incelemek için fırsatlar sağlamıştır. Sinomolgus maymunlarında deneysel olarak ortaya çıkan siliyer cisimcik iltihabının UVS çıkışını arttırdığı gösterilmiştir [100]. Farede oküler inflamasyonu tetikleyen ve in-vivo hiperspektral görüntüleme ile lenfatik drenajı değerlendiren çalışmalar, oküler inflamasyon ve lenfatik drenaj arasındaki ilişkiyi anlamada yardımcı olabilir. Dolayısıyla İntraoküler tümörler bölgesel lenf nodlarına yayılarak metastaz yapabilirler [101,102].

Sonuç

Bu çalışma; Wistar albino ratlarda her iki cinste, gözde lenfatik drenajın doğrudan kanıtı niteliğindedir. Gözden lenfatik drenaj ilk kez QD ve İCG karşılaştırmalı olarak hiperspektral floresan görüntüleme teknikleri ile in vivo olarak görüntülenmiştir. Floresan görüntü cene altı lenf yumrusunda alınırken cervical bölgedeki lenf yumrularından floresan görüntü alınmayışı önemlidir. Bu çalışma ile elde edilen bulgular, bu fare modelinin oküler lenfatik dolaşımını hedefleyen ilaçların gelecekteki tarama çalışmaları için potansiyel kaynak olarak kullanılmasını desteklemektedir. Derin dokuda QD sinyalini in vivo hiperspektral görüntüleme sistemi ile saptamak için sınırlı duyarlılık nedeniyle, QD sinyalini derin anatomik yapılarda görüntülemesini almak zor olduğu görülmüştür. Bu problemi ortadan kaldırmak için NIR bölgede yada bu bolgeye çok yakın emisyon veren nano partiküller ve buna uygun filtreler kullanılmalıdır. Araştırmada ICG'nin daha etkin olduğunu görülmesinin sebebi emisyonunun 780-830 nm aralıkta olması,kısaca NIR bölgeye yakın olmasıdır diyebiliriz. Biyouyumlu problemlerin gelecekteki gelişimi ve daha duyarlı hiperspektral görüntüleme yöntemleri yine de bu dezavantajları atlatabilir ve klinik öncesi bulguların kör edici göz hastalığının tedavisine yönelik klinik çalışmalara dönüştürülmesini sağlayacaktır.

Ulaşılmayı düşünülen hedefler:

Türkiye şartlarında oldukça zor olan bu konu dünyada da 3-4 adet yapılan çalışmalardan bir çalışmadır. Göz iç basıncını düzenleyen yapılardan biri olan Schlemm kanalının cene altı lenf yumrusuna bağlandığı hem elektron mikroskopik seviyede hemde invivo imaging görüntüleme ile tespiti yapıldığına göre:

- 1-Schlemm Lenf kanalının immun histokimyasal floresan yapısını çıkartabilmek ona uygun proteinle Qdot655 'i birbirine bağlayarak bir nanopartikül prob elde etmek, ve bu probu kullanarak floresan mikroskopunda tespit edilmesi,
- 2- Çalışma materyalini Balb-c'ler ve transgenik bir tür olan CR57B6/L farelerinde karşılaştırma yapmak çalışmaya bir başka derinlik kazandırmak,
- 3- Glukom tedavsinde kullanılan çeşitli prostoglandin türevi kimyasallar kullanılarak gözdeki lenf kanalları üzerinde indükleyici etkilerini tespit etmek,
- 4- Paramanyetik Qdot'lar kullanılarak Micro-CT görüntüsünü alabilmek suretiyle göz ile lenf yumrusu arasındaki irtibat ortaya konulmalıdır.

5.BÖLÜM

KAYNAKLAR:

- [1]. Breiteneder-Gele S., Soleiman A., Kowalski H. et al., Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium, *American J. Pathology*, 154 [1999] 385–394.
- [2]. Banerji S., Ni J., Wang S.X. et al., LYVE-1, A new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan, *J. Cell Biology*. 144 [1999] 789–801.
- [3]. Lucarelli R.T., Ogawa M., Kosaka N., et al., New approaches to lymphatic imaging, *Lymphat. Res. Biol.* 7 [2009] 205–214.
- [4]. Jaiswal J.K., Mattoussi H., Mauro J.M., Simon S.M., Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates, *Nature Biotechnol.*, 21 [2003] 47–51.
- [5]. Kosaka N., Ogawa M., Sato N., et al., In vivo real-time, multicolor, quantum dot lymphatic imaging, *J. Invest. Dermatol.*, 129 [2009] 2818–2822.
- [6]. Kobayashi H., Hama Y., Koyama Y., et al., Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots, *Nano Lett.*, 7 [2007] 1711–1716.
- [7]. Rosenblum L.T., Kosaka N., Mitsunaga M., et al., In vivo molecular imaging using nanomaterials: general in vivo characteristics of nano-sized reagents and applications for cancer diagnosis, *Mol. Membr. Biol.*, 27 [2010] 274–285.
- [8]. Shibuya M., Claesson-Welsh L., Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Experimental Cell Research*, 312 [2006] 549–560.
- [9]. Albuquerque R.J., Hayashi T., Cho W.G., et al., Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth, *Nature Medicine*, 15 [2009] 1023–1030.
- [10]. Barone R., Simoens P., *Anatomie comparee des mammiferes domestiques. Tome 7 Neuorologie. II. Systeme Nervoux perifeque Glandes endocrines Esthesiologie.* Vigot. [2010] pp 605-617.

- [11]. Getty R., Sisson and grosman's the anatomy of the domestic animals, Fifth. Ed. Volume 1. W.B. Saunders Company. Philadeplhia, London, Toronto, [1975] pp 1751-1768.
- [12]. Miller E.M., Miller's anatomy of the dog, Third. Ed. [1993] pp 1027.
- [13]. Van-Buskirk E.M., The canin eye: the vessels of aqueous drainage, Invest. Ophthamol. Vis. Sci.18 [1979] 233-230.
- [14]. Lutjen-Drecoll E and Rohen J Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology, ed W Tasman and Jaeger E.A. [Philadelphia: J.B. Lippincott Company] [1992] pp 1-33.
- [15]. Cula N. Dautriche., Yangzi Tian., Yubing Xie and Susan T. Sharfstein. A Closer Look at Schlemm's Canal Cell Physiology:Implications for Biomimetics. J. Funct. Biomater. 6 [2015] 963-85.
- [16]. Maepea O and Bill A. Pressures in the juxtacanalicular tissue and Schlemm's canal in monkeys. Exp Eye Res. 54 [1992] 879-83.
- [17]. Ramos R.F., Hoying J.B., Witte M.H., Daniel Stamer W. Schlemm's Canal Endothelia, Lymphatic, or Blood Vasculature? J Glaucoma. 16 [2007] 391-405.
- [18]. Robert N Weinreb, Tony Realini, Rohit Varma. Latanoprostene Bunod, a Dual-acting Nitric Oxide Donating Prostaglandin Analog for Lowering of Intraocular Pressure. US Ophthalmic Review. 9[2] [2016] 80-7.
- [19]. McLaren N.C and Moroi S.E. Clinical implications of pharmacogenetics for glaucoma therapeutics. The Pharmacogenomics Journal. 3 [2003] 197-201.
- [20]. Bill A. Conventional and uveo-scleral drainage of aqueous humour in the cynomolgus monkey [Macaca irus] at normal and high intraocular pressures. Exp Eye Res. 5 [1966] 45-54.
- [21]. Inomata H., Bill A. and Smelser G.K. Unconventional routes of aqueous humor outflow in Cynomolgus monkey [Macaca irus] Am J Ophthalmol. 73 [1972] 893-907.
- [22]. Ujii K and Bill A. The drainage routes for aqueous humor in monkeys as revealed by scanning electron microscopy of corrosion casts. Scan Electron Microsc. [1984] 849-5668.
- [23]. Toris C.B., Gregerson D.S and Pederson J.E. Uveoscleral outflow using different-sized fluorescent tracers in normal and inflamed eyes Exp Eye Res 45 [1987] 525-52.
- [24]. Inomata H. and Bill A. Exit sites of uveoscleral flow of aqueous humor in cynomolgus monkey eyes. Exp Eye Res. 25 [1977] 113-8.

- [25]. Aihara M., Lindsey J.D. and Weinreb R.N. Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 [2003] 5168-73.
- [26] . Bill A. Aqueous humor dynamics in monkeys [*Macaca irus* and *Cercopithecus ethiops*]. *Exp Eye Res.* 11 [1971] 195-206.
- [27]. Kim M., Johnston M.G., Gupta N., Moore S. and Yucel Y.H. A model to measure lymphatic drainage from the eye. *Exp Eye Res.* 93 [2011] 586-91.
- [28]. Bill A. Aspects of the drainage of aqueous humor in cats. *Arch Ophthalmol.* 67 [1962] 148-55.
- [29] . Townsend D.J. and Brubaker R.F. Immediate effect of epinephrine on aqueous formation in the normal human eye as measured by fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 19 [1980] 256-66.
- [30]. Toris C.B., Camras C.B. and Yablonski M.E. Effects of PhXA41, a new prostaglandin F2 alpha analog, on aqueous humor dynamics in human eyes. *Ophthalmology.* 100 [1993] 1297-304.
- [31]. Bill A. The routes for bulk drainage of aqueous humour in rabbits with and without cyclodialysis. *Doc Ophthalmol.* 20 [1966] 157-69.
- [32]. Suguro K, Toris C.B. and Pederson J.E. Uveoscleral outflow following cyclodialysis in the monkey eye using a fluorescent tracer. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26 [1985] 810-3.
- [33]. Bill A. Effects of atropine and pilocarpine on aqueous humour dynamics in cynomolgus monkeys [*Macaca irus*]. *Exp Eye Res.* 6 [1967] 120-5.
- [34] . Bill A. and Phillips C.I. Uveoscleral drainage of aqueous humour in human eyes. *Exp Eye Res.* 12 [1971] 275-81.
- [35] . Crawford K. and Kaufman P.L. Pilocarpine antagonizes prostaglandin F2 alpha-induced ocular hypotension in monkeys. Evidence for enhancement of Uveoscleral outflow by prostaglandin F2 alpha. *Arch Ophthalmol.* 105 [1987] 1112-6.
- [36] . Gabelt B.T. and Kaufman P.L. Prostaglandin F2 alpha increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res.* 49 [1989] 389-402.
- [37] . Nilsson S.F., Sperber G.O. and Bill A. The effect of prostaglandin F2 alpha-1-isopropylester [PGF2 alpha-IE] on uveoscleral outflow. *Prog Clin Biol Res.* 312 [1989] 429-36.

- [38]. Cursiefen C., Maruyama K., Jackson D.G., Streilein J.W., Kruse F.E. Time course of angiogenesis and lymphangiogenesis after brief corneal inflammation. *Cornea*. 25 [2006] 443–7.
- [39]. Ling S., Lin H., Liangetal L., Development of new lymphatic vessels in alkali-burned corneas. *Acta Ophthalmologica*. 87 [2009] 315–22.
- [40]. Singh D., Conjunctival lymphatic system. *J Cataract and Refractive Surgery*. 29 [2003] 632–3.
- [41]. Birke K., Lutjen-Drecoll E., Kerjaschki D., et al., Expression of podoplanin and other lymphatic markers in the human anterior eye segment. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 51 [2010] 344–54.
- [42]. Shintaro Nakao, Ali Hafezi-Moghadam, and Tatsuro Ishibashi. Lymphatics and Lymphangiogenesis in the Eye. *Journal of Ophthalmology*. 2012, Article ID 783163, 11 pages.
- [43]. Bill A., Blood circulation and fluid dynamics in the eye, *Physiological Reviews*, 55 [1975] 383–417.
- [44]. Björndahl M., Cao R., Nissen L. J. et al., “Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 [43] [2005] 15593–98.
- [45]. Nakao S., Maruyama K., Zandi S., et al., Lymphangiogenesis and angiogenesis: concurrence and/or dependence? Studies in inbred mouse strains. *The FASEB Journal*. 24 [2010] 504–513.
- [46]. Wuest T.R. and Carr D.J. VEGF-A expression by HSV- 1-infected cells drives corneal lymphangiogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 207 [2010] 101–15.
- [47]. Mc Getrick J.J., Wilson D.G., Dortzbach R.K., et al., A search for lymphatic drainage of the monkey orbit. *Arch Ophthal*. 107 [1989] 255–60.
- [48]. Dickinson A.J., Gausas R.E., Orbital lymphatics: do they exist? *Eye*. 20 [2006] 1145–8.
- [49]. Sherman D.D., Gonnering R.S., Wallow I.H., et al., Identification of orbital lymphatics: enzyme histochemical light microscopic and electron microscopic studies. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*. 9 [1993] 153–169.
- [50]. Kawasaki E.S., Player A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 1 [2005] 101-9.

- [51]. Alivisatos A.P., Gu W., Larabell C., Quantum dots as cellular probes. *Annu Rev Biomed Eng.* 7 [2005] 55-76.
- [52]. Chan et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current opinion in biotechnology.* 13 [2002] 40-6.
- [53]. Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., et al., Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science.* 307 [2005] 538-44.
- [54]. Banerjee S., Kar S., Perez J.M., Santra S., Quantum dot based OFF/ON probe for detection of glutathione. *J Phys Chem C.* 113 [22] [2009] 9659-63.
- [55]. Jaiswal J.K., Mattoussi H., Mauro J.M. and Simon S.M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature Biotechnol.* 21 [2003] 47–51.
- [56]. Kosaka N., Ogawa M., Sato N., Choyke P.L. and Kobayashi H. In vivo real-time, multicolor, quantum dot lymphatic imaging. *J Invest Dermatol.* 129 [2009] 2818–22.
- [57]. Kobayashi H., Hama Y., Koyama Y., Barrett T., Regino C.A., Urano Y. and Choyke P.L. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots. *Nano Lett.* 7 [2007] 1711–6.
- [58]. Rosenblum L.T., Kosaka N., Mitsunaga M., Choyke P.L. and Kobayashi H. In vivo molecular imaging using nanomaterials: general in vivo characteristics of nano-sized reagents and applications for cancer diagnosis *Mol. Membr. Biol.* 27 [2010] 274–85.
- [59]. Santra S., Yang H.S., Holloway P.H., et al., Synthesis of water-dispersible fluorescent, radio-opaque, and paramagnetic CdS:Mn/ZnS quantum dots: A multifunctional probe for bioimaging. *J. Am. Chem. Soc.*, 127 [2005] 1656-7.
- [60]. Shintaro N., Hafezi-Moghadam A., Ishibashi T., Lymphatics and lymphangiogenesis in the eye. *J Ophthalmology.* Article ID 783163, doi:10.1155/2012/783163 [2012] 1-11.
- [61]. Alex L., Tam C., Gupta N., et al., Quantum dots trace lymphatic drainage from the mouse eye. *Nanotechnology*, 22 [2011] 425101 pp 6.
- [62]. Yücel Y.H., Johnston M.G., Ly Tina, et al., Identification of lymphatics in the ciliary body of the human eye. A novel ‘uveolymphatic’ outflow pathway. *Exp. Eye Res.* 89 [2009] 810–9.
- [63]. Kim M.A. A model to measure lymphatic drainage from the eye. Degree of Master of Science Graduate department of Laboratory Medicine and Pathobiology University of Toronto. [2011].

- [64]. Ninomiya Hiroyoshi and Inomata T. Microvasculature of the Mouse eye: Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Journal of Exp Animal Sci.* 43 [2006] 149-59.
- [65]. Morrison J.C., Johnson E.C., Cepurna W.O., Funk R.H., Microvasculature of the rat optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40[8] [1999] 1702-9.
- [66]. Morrison J.C., Fraunfelder F.W., Milne S.T., Moore C.G. Limbal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36 [3] [1995] 751-6.
- [67]. Gruntzig J., Kiem J., Becker V., Schwarzhoff V., Feinendegen L.E., Schicha H. Drainage of the radioactive lymphotropic tracers ¹⁹⁸ Au-colloid and ^{99m} Tc-sulfur colloid from the orbit in rabbits. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* 204 [1977] 161-75.
- [68]. Gruntzig J., Schicha H., Kiem J., Becker V., Feinendegen L.E. Studies on the lymph drainage of the eye 5. Quantitative registration of the lymph drainage from the subconjunctival space with a radioactive tracer. *Klin Monatsbl Augenheikd.* 172 [1978a] 872-6.
- [69]. Gruntzig J., Schicha H., Becker V., Kiem J., Feinendegen L.E. Studies on the lymph drainage of the eye 4. Drainage of lymphotropic radioactive tracers [^{99m}Tc-Microcolloid] after intravitreal injection. *Klin Monatsbl Augenheikd.* 172 [1978b] 87-94.
- [70]. Gruntzig J., Schicha H., Huth F. Eye and lymph drainage. *Z Lymphol.* 3 [1979] 35-45.
- [71]. Bill A. Aqueous humor dynamics in monkeys [*Macaca irus* and *Cercopithecus ethiops*]. *Exp Eye Res.* 11 [2] [1971] 195-206.
- [72]. Aihara M., Lindsey J.D., et al., Aqueous humor dynamics in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44 [12] [2003] 5168-73.
- [73]. Barrie K.P., Gum G.G., et al. Quantitation of uveoscleral outflow in normotensive and glaucomatous beagles by ³H-labeled dextran. *Am J Vet Res.* 46 [1] [1985] 84-8.
- [74]. Bill A. Formation and drainage of aqueous humour in cats. *Exp Eye Res.* 5 [1966a] 185-90.
- [75]. Quin J.W., Shannon A.D. The effect of anaesthesia and surgery on lymph flow, protein and leucocyte concentration in lymph of the sheep. *Lymphology.* 8 [4] [1975] 126-35.

- [76]. Negrini D., Moriondo A. Apr 11. Lymphatic anatomy and biomechanics. *J. Physiol.* [Epub ahead of print] from Minhui Kim at all. [2011] A model to measure lymphatic drainage from the eye. *Experimental Eye Research.* 93 [2011] 586-91.
- [77]. Inoue Y, Kiryu S, Watanabe M., Oyaizu N. and Ohtomo K. Fluorescence lymph node mapping in living mice using quantum dots and a compression technique. *J Fluoresc.* 20 [2010] 599-606.
- [78]. Cao Y., Yang K., Li Z., Zhao C., Shi C. and Yang J. Near-infrared quantum-dot-based non-invasive in vivo imaging of squamous cell carcinoma U14. *Nanotechnology.* 21 [2010] 475104.
- [79]. Rosenblum L.T., Kosaka N., Mitsunaga M., Choyke P.L. and Kobayashi H. Optimizing quantitative in vivo fluorescence imaging with near-infrared quantum dots *Contrast Media Mol Imaging.* *Contrast Media Mol Imaging.* 6 [2011] 148–52.
- [80]. Morrison J.C., Johnson E., Cepurna W.O. Rat models for glaucoma research. *Prog Brain Res.* 173 [2008] 285-301.
- [81]. Adrian Smedowski, Marita Pietrucha-Dutczak, Kai Kaarniranta, and Joanna Lewin-Kowalik . A rat experimental model of glaucoma incorporating rapid-onset elevation of intraocular pressure. *Sci Rep.* 4 [2014] 5910.
- [82]. Toris C.B. Aqueous humor dynamics I. In: Civan, M.M. [Ed.], *Current Topics in Membranes, the Eye's Aqueous Humor*, second ed. vol. 62. Academic Press, San Diego, pp. [2008] 193- 229.
- [83]. Nilsson S.F., Sperber G.O. and Bill A. The effect of prostaglandin F2 alpha-1-isopropylester [PGF2 alpha-IE] on uveoscleral outflow. *Prog Clin Biol Res.* 312 [1989] 429-36.
- [84]. Goh Y., Araie M., Nakajima M., Azuma I., Hayaishi O. Effect of topical prostaglandin D2 on the aqueous humor dynamics in rabbits. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 227 [1989] 476-81.
- [85]. Toris C.B., Yablonski M.E., Wang Y.L., Hayashi M. Prostaglandin A2 increases uveoscleral outflow and trabecular outflow facility in the cat. *Exp Eye Res.* 61 [6] [1995] 649-57.
- [86]. Johnston, M.G., Involvement of lymphatic collecting ducts in the physiology and pathophysiology of lymph flow. In: Johnston, M.G. [Ed.], *Experimental Biology of the Lymphatic Circulation.* Elsevier Science Publishers, B.V. [1985]. pp. 81-120.

- [87]. Amann-Vesti, B.R., Gitzelmann, G., et al. Soprostone 8-epi-prostaglandin F2 alpha decreases lymph capillary pressure in patients with primary lymphedema. *J Vasc Res.* 40 [1] [2003] 77-82.
- [88]. Gerometta, R., Podos, S.M., et al. Steroid-induced ocular hypertension in normal sheep. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50 [2] [2009] 669-73.
- [89]. Gerometta R., Alvarez L.J., et al., Effects of sildenafil and tadalafil on intraocular pressure in sheep: implications for aqueous humor dynamics. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 51 [6] [2010a] 3139-44.
- [90]. Xu H., Chen M., Reid D.M. and Forrester J.V. LYVE-1-positive macrophages are present in normal murine eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48 [2007] 2162-71.
- [91]. Poyer J.F., Millar C. and Kaufman P.L. Prostaglandin F2 alpha effects on isolated rhesus monkey ciliary muscle *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36 [1995] 2461-5.
- [92]. Thieme H., Schimmat C., Munzer G., Boxberger M., Fromm M., Pfeiffer N. and Rosenthal R. Endothelin antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F2alpha and fluprostenol on trabecular meshwork contractility *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47 [2006] 938-45.
- [93]. Zawieja D.C., Davis K.L., Schuster R., Hinds W.M. and Granger H.J. Distribution, propagation, and coordination of contractile activity in lymphatics *Am J Physiol.* 264 [1993] 1283-91.
- [94]. Lindsey J.D., Kashiwagi K., Boyle D., Kashiwagi F., Firestein G.S. and Weinreb R.N. Prostaglandins increase proMMP-1 and proMMP-3 secretion by human ciliary smooth muscle cells. *Curr Eye Res.* 15 [1996] 869-75.
- [95]. Lindsey J.D., Kashiwagi K., Kashiwagi F. and Weinreb R.N. Prostaglandins alter extracellular matrix adjacent to human ciliary muscle cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38 [1997] 2214-23.
- [96]. Ocklind A. Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections *Exp Eye Res.* 67 [1998] 179-91.
- [97]. Husain S., Whitlock N.A., Rice D.S. and Crosson C.E. Effects of latanoprost on rodent intraocular pressure. *Exp Eye Res.* 83 [2006] 1453-8.
- [98]. Toris C.B., Risma J.M., Gonzales-Martinez J., McLaughlin M.A. and Dawson W.W. Aqueous humor dynamics in inbred rhesus monkeys with naturally occurring ocular hypertension. *Exp Eye Res.* 91 [2010] 860-5.

- [99]. Aihara M., Lindsey J.D. and Weinreb R.N. Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44 [2003] 4314-20.
- [100]. Toris C.B. and Pederson J.E. Aqueous humor dynamics in experimental iridocyclitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 28 [1987] 477-81.
- [101]. Tojo D., Wenig B.L. and Resnick K.I. Incidence of cervical metastasis from uveal melanoma: implications for treatment. *Head Neck.* 17 [1995] 137-9.
- [102]. Dithmar S., Diaz C.E. and Grossniklaus H.E. Intraocular melanoma spread to regional lymph nodes: report of two cases. *Retina.* 20 [2000] 76-9.